Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

ÜBER DIE WIRKUNG VON CYTOKININEN AUF DIE SYNTHESE VON PROTEINEN UND NUKLEINSÄUREN IN ETIOLIERTEN PRIMÄRBLÄTTERN VON PHASEOLUS VULGARIS L

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dierk Paul
aus Uslar

Göttingen 1974

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

ÜBER DIE WIRKUNG VON CYTOKININEN AUF DIE SYNTHESE VON PROTEINEN UND NUKLEINSÄUREN IN ETIOLIERTEN PRIMÄRBLÄTTERN VON PHASEOLUS VULGARIS L

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dierk Paul
aus Uslar

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. Feierabend
Korreferent: Prof. Dr. Jacobi

Tag der mündl. Prüfung: 3. Juli 1974

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material und Anzucht 3

2. Extraktion der Nukleinsäuren 4

3. Aufarbeitung der Extrakte 5

4. Auswertung der Untersuchungen 12

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Die Wirkung von Cytokininen auf das Enzymmuster in etiolierten Primärblättern 13

B. Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt der Primärblätter 14

C. DNA der Primärblätter 16

1. Vergleich der DNA-Bestimmungsmethoden 17

2. DNA-Gehalt pro Primärblatt während der Keimlingsentwicklung 18

3. Prozentualer Anteil der DNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt

a) Abhängigkeit von der Keimungsdauer 19

b) Abhängigkeit von der Behandlung der Keimlinge 21

D. Veränderungen im sRNA-Gehalt 22

E. rRNA-Gehalt der Primärblätter 23

1. Veränderungen im Anteil fällbarer rRNA an der Gesamt-Nukleinsäure-Menge 23

2. Abhängigkeit der rRNA-Menge pro Primärblatt von der Cytokinin-Versorgung 25

F. Quantitativer Vergleich der rRNA mit anderen Nukleinsäure-Fraktionen

1. rRNA/sRNA-Verhältnis 26

2. Verhältnis der rRNA- und DNA-Zunahme in anzuchtgleichen Primärblättern 27

G. Fraktionen der rRNA 32

1. Unterfraktionen von jeweils cytoplasmatischer und plastidärer rRNA 32

2. Nukleinsäure-Anteile der cytoplasmatischen und plastidären Ribosomen 34

a) Cytoplasmatische rRNA ($rRNA_{cyt}$) 35

b) Plastidäre rRNA ($rRNA_{plast}$) 36

3. Anteil der plastidären rRNA an der Gesamt-rRNA 37
H. Nukleotidverteilung in der RNA 38
1. Vergleich der Verhältnisse der Purin- und Pyrimidin-Anteile in Gesamt-RNA und rRNA während der Primärblattentwicklung 39
2. Basenzusammensetzung der RNA in 168 Std. alten Primärblättern 41
IV. DISKUSSION 43
V. ZUSAMMENFASSUNG 54
VI. LITERATURVERZEICHNIS 57

Verzeichnis der in Text und Bild verwendeten Abkürzungen

A	Adenylat
AMP	Adenosin-monophosphat
CMP	Cytidin-monophosphat
cytopl.(-$_{cyt}$)	cytoplasmatisch
2,4D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
6FAP	6-Furfurylaminopurin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GMP	Guanosin-monophosphat
IAA	Indolyl-3-essigsäure
Kin	Kinetin
mA	Milliampere
mRNA	messenger-RNA
mW	(Keimlinge) mit Wurzel
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
oW	(Keimlinge) ohne Wurzel
6PGSDH	6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase
plast.(-$_{plast}$)	plastidär
Prim.Bl.	Primärblätter
Pur	Purin
Pyr	Pyrimidin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RuDPCO	Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase
ShikSDH	Shikimisäure-Dehydrogenase
sRNA	niedermolekulare RNA
T	Tween20
TPN	= NADP: Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Uridylat
UMP	Uridin-monophosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534926_0013

I. EINLEITUNG

Die frühe Entwicklung der Primärblätter höherer Pflanzen ist gekennzeichnet durch eine morphologische und physiologische Umgestaltung der Zellorganisation. Bereits während der heterotrophen Keimphase entstehen im Hinblick auf die zukünftige autotrophe Lebensweise in den Etioplasten von Primärblättern bei Roggen sowohl scheibenförmige Thylakoide wie auch Enzyme des Calvin-Zyklus (FEIERABEND, 1965; BERGER u. FEIERABEND, 1967). Das Ausmaß, in dem die Plastidenenzyme gebildet werden, hängt im Dunkeln weitgehend vom Hormonhaushalt des Keimlings ab. So wird bei etiolierten Roggenkeimlingen nach Kinetin-Applikation eine vergleichbar hohe Aktivität an Carboxydismutase gemessen wie bei Anzuchten im Dauerlicht (FEIERABEND, 1969).

In Gewebekulturen von Tabak differenzieren sich die Proplastiden nur dann zu Chloroplasten aus, wenn das Kulturmedium Kinetin enthält (STETLER u. LAETSCH, 1965). Die Förderung der Proteinsynthese (KULAEVA u. ROMANKO, 1967; RICHMOND et al, 1971) und der RNA-Synthese (WOLLGIEHN u. MUNSCHE, 1972) in isolierten Chloroplasten scheinen auf eine direkte Wirkung von Cytokininen auf den Plastiden ebenso hinzuweisen wie die Stimulierung der Chlorophyllsynthese bei Belichtung etiolierter Bohnen-Primärblätter, die im Dunkeln mit Kinetin vorbehandelt waren (SUGIURA, 1963, zit. bei KIRK, 1970).

Bei Bohnenpflanzen steigert ein erhöhtes Cytokinin-Angebot in den Blättern die Photosyntheserate und die Aktivität der Carboxydismutase (WAREING et al, 1968; TREHARNE et al, 1970). Die Autoren schließen eine Neusynthese von plastidärer rRNA und des Fraktion-I-Proteins als Grund für die Aktivitätssteigerung der Carboxydismutase in ausgewachsenen Bohnenblättern aus. In Primärblättern etiolierter Roggenkeimlinge läßt sich dagegen die Aktivitätszunahme der Carboxydismutase vollkommen unterdrücken, wenn die Proteinsynthese an den plastidären 70S Ribosomen durch Chloramphenicol gehemmt ist; appli-

ziertes Kinetin macht diese Hemmung nicht rückgängig (FEIERABEND, 1970).

Als Hauptbildungsort der Cytokinine wird die Wurzel angesehen (vgl. AUDUS, 1972). Den Befunden an Roggen (sh. o.) vergleichbar sind auch in Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge Enzyme des reduktiven mehr als die des oxydativen Pentosephosphat-Zyklus betroffen, wenn das Cytokinin-Angebot nach Abschneiden der Wurzeln vermindert ist (PAUL, 1970). Es erhebt sich die Frage, welcher Mechanismus für die spezielle Wirkung der Cytokinine auf die Plastidenmorphogenese verantwortlich ist.

Vergleichend mit den enzymatischen Befunden bei etiolierten Bohnenkeimlingen wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich die unterschiedliche Cytokinin-Versorgung während der Primärblatt-Entwicklung auf dem Niveau der Nukleinsäuren auswirkt.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material und Anzucht

Untersucht wurden die Primärblätter etiolierter Keimlinge von Phaseolus vulgaris L var. Saxa, Ernte 1971.

Nachdem das verwendete Saatgut im Dunkeln mit 6%iger, frischer Chlorkalklösung oberflächlich sterilisiert (30 Min. im Exsikkator) und anschließend über 2 Std. mehrmals mit H_2O-dest. gewaschen worden war, wurden jeweils 16 Samen unter grünem Sicherheitslicht auf 2 Lagen Filterpapier (Schleicher u. Schüll Nr. 598) und 30 ml Austauscherwasser in Petrischalen (Ø 14 cm) ausgelegt. Um eine direkte Benetzung der Samen während der Keimung zu vermeiden, wurden die Petrischalen um 8° geneigt in den bei SEESCHAAF (1967) beschriebenen Holzgestellen gestapelt. Die Samen keimten im Dunkeln bei 22°C im Thermostaten.

Nach 50 Std. Dunkelkeimung wurde einem Teil der Keimlinge die Wurzel abgeschnitten; nach 100 Std. erfolgte die Applikation von Kinetin (10^{-4} g/ml, gelöst in H_2O-dest. und 0,01 % Tween20). Da ausschließlich der epikotyle Keimsproß und vorrangig die Primärblätter mit der Kinetin-Lösung in Berührung kommen sollten, wurden firstartige Gerüste mit aufgeschlitzter Oberkante verwendet (Werkstattanfertigung, sh. Abb. 1 - S. 4 -), die ihrerseits in Plastikschalen (Kühlschrankdosen aus Hartplastik: 22,5 x 33,5 x 9,0 cm^3) standen. Diese Plastikschalen enthielten die Lösung mit Kinetin/Tween bzw. vergleichsweise nur Tween, in welche die Primärblätter während der 3-stündigen Behandlung eintauchten. Tween20 (Endkonzentration 0,01 %) wurde jeder Kinetin-Applikation als Netzmittel beigegeben. Die aufwärts gerichteten Hypokotylstümpfe der Keimlinge wurden mit feuchtem Fließpapier abgedeckt und die Keimlinge verdunkelt gehalten.

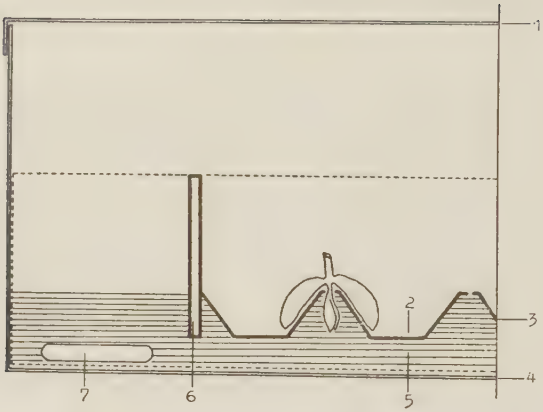

Abb. 1 Schale und Einsatz zur Hormonbehandlung der Primärblätter; der Schnitt zeigt nur die ersten beiden der insgesamt acht Rinnen.

1 Schalendeckel; 2 trockene Rinnen, in welche die Kotyledonen hineinragen; 3 firstartiges Gerüst mit aufgeschlitzter Oberkante und einem eingesetzten Bohnenkeimling (Wurzel abgeschnitten); 4 Schalenboden; 5 Behandlungsflüssigkeit; 6 Abtrennung des Einsatzes gegen den Raum, in dem mittels Magnetrührer eine leichte Turbulenz erzeugt wird; 7 Rührmagnet.

2. Extraktion der Nukleinsäuren

Pro Ansatz wurden jeweils 40 Primärblätter unter grünem Sicherheitslicht von Keimlingen mit der angegebenen Keimungsdauer und Vorbehandlung abgezupft und in H_2O-dest. gewaschen. Die Primärblätter wurden im Mörser bei Zimmertemperatur in Anlehnung an die Methode von PARISH u. KIRBY (1966) homogenisiert mit 10 ml 0,05M Tris-HCl-Puffer, der 0,01M $MgSO_4$ x 7 H_2O, 1 % (Gew./Vol.) TNS (Tri-isopropylnaphtalensulfonsäure), 1 % (Gew./Vol.) NaCl, 6 % (Vol./Vol.) Phenol-Cresol (1,4 ml mCresol in 10 ml wassergesättigtem Phenol) enthielt.

Das anschließend mit 10 ml reinem Phenol-Cresol-Gemisch (sh. o.) vermengte Homogenat wurde mehrmals leicht umgerührt und nach 3-stündiger Extraktion (Zimmertemperatur) bei 5000 UpM (Christ Heraeus UJ II) 15 Min. lang zentrifugiert. Niederschlag und Phenolphase (nicht jedoch die Zwischenphase) wurden verworfen.

Zum Überstand wurden 0,5 ml einer 3M NaCl-Lösung (in H_2O-dest.) zugegeben, die Pufferphase nochmals mit 10 ml Phenol-Cresol-Gemisch ausgeschüttelt und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert und in vorgekühltem, 96%igem vergälltem Äthanol gesammelt.

Desgleichen wurden die nachfolgenden Überstände gesammelt, die bei zweimaligem Waschen mit 0,05M Tris-HCl-Puffer (0,01M $MgSO_4$ x 7 H_2O, pH 7,6) und abschließendem Waschen mit 0,05M Tris-HCl-Puffer (0,01M $MgSO_4$ x 7 H_2O, pH 9,0) anfielen.

Die vereinigten Überstände wurden in etwa dem 3-fachen Volumen an 96%igem vergälltem Äthanol bei -10°C mindestens 24 Std. lang ausgefällt.

Nach Abzentrifugieren (Christ Heraeus UJ II, je 10 Min. bei 5000 UpM), Waschen mit 96%igem Äthanol und oberflächlicher Trocknung (etwa 3 Std., bei Zimmertemperatur, im Dunkeln) wurde der Gesamt-Nukleinsäure-Niederschlag in 6 ml Puffer (sh. u.) vollständig gelöst.

3. Aufarbeitung der Extrakte

Für die Lösung des Nukleinsäure-Niederschlags (sh. o.: äthanolische Fällung), die photometrischen Messungen (GILFORD-Photometer) sowie für die Fraktionierungen wurde einheitlich nachfolgender Puffer verwendet (vgl. Elektrophorese-Laufpuffer).

Pro 5000 ml H_2O-dest.: Tris(hydroxymethyl)aminomethan 21,70 g

NaH_2PO_4 x 2 H_2O 23,40 g

Na_2-EDTA x 2 H_2O 1,85 g

pH 7,6 - 7,8

Schema der Untersuchungsabfolge

Gesamt-Nukleinsäuren von 40 Primärblättern, gelöst in 6 ml Puffer; davon aufgearbeitet:

ml:	Methode:	Messung folgender Fraktionen:
0,2	photometrische Messung bei 260 nm und 310 nm	Nukleinsäuren/40 Primärblätter (in $OD_{260 - 310}$)
1,0	Gelelektrophorese (2,4%ige Polyacrylamid-Gele) planimetrische Auswertung	rRNA-Unterfraktionen rRNA/DNA
2,0	Chromatographie an MAK-Säulen	Gehalt an sRNA und DNA in 40 Primärblättern
1,0	Hydrolyse der RNA mit NaOH	DNA-Menge/40 Primärblätter
1,0	Fällung in 10%iger NaCl-Lösung nach Hydrolyse der hochmolekularen RNA (rRNA) mit KOH: Dowex-Chromatographie	a) Überstand: DNA, niedermolekulare RNA, Nukleotide b) Niederschlag: hochmolekulare RNA (rRNA) c) Nukleotide der hochmolekularen RNA (rRNA)
0,5	nach Hydrolyse der Gesamt-Nukleinsäuren mit KOH: Dowex-Chromatographie	Nukleotide der Gesamt-RNA

Acrylamid-Gel-Elektrophorese

Gelpräparation nach LOENING (1967)

Stammlösung 1: 15,0 g rekristallisiertes Acrylamid
0,75 g Bis-Acrylamid
gelöst in 100 ml H_2O-bidest.

Stammlösung 2: 2,17 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
2,34 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O
0,185 g Na_2-EDTA x 2 H_2O
gelöst in 100 ml H_2O-bidest.

Ansatz für 2,4%ige Gele:
19,7 ml H_2O-bidest.
5,0 ml Stammlösung 1
6,25 ml Stammlösung 2

Nach Entgasen im Exsikkator werden dem Ansatz hinzugefügt:
0,25 ml 10%ige Lösung von Ammoniumperoxodisulfat
0,025 ml Temed (NNN'N'-Tetramethyläthylendiamin)

Die gut durchmischte Lösung wurde dann unmittelbar in Plexiglasröhrchen (Ø 5 mm, Länge 10 cm) blasenfrei und gleichmäßig bis etwa 1 cm unterhalb des oberen Randes eingefüllt; die unteren Öffnungen der Plexiglasröhrchen wurden vorher mit Schlauchstückchen verengt. Die Röhrchen mit den polymerisierten Gelen (nach etwa 1 Std.) wurden in Elektrophorese-Töpfe (vgl. KERSTEN, 1973) eingesetzt und beide Kammern mit gekühltem Laufpuffer aufgefüllt, der 1/5 der Konzentration der Stammlösung 2 und pro 1000 ml 2 g SDS (Na-Dodecylsulfat) enthielt.

Die obere Elektrophoresekammer wurde an den negativen Pol, die untere an den positiven Pol eines Gleichstromnetzgerätes (HEATHKIT-Regulated H.V. Power Supply Modell IP-17) angeschlossen und die unbeladenen Gele mit 15 mA/12 Gele etwa

1/2 Std. vorlaufen gelassen. Nach Stromregulierung auf 50 mA pro 12 Gele wurden ca. 0,80 OD_{260}, jedoch nicht mehr als 0,1 ml des zu untersuchenden, mit dem Färbemittel Bromphenol-Blau (0,005 ml einer 0,15%igen Lösung in H_2O-dest. auf 1 ml Nukleinsäure-Extrakt) gut vermischten Extraktes auf die Geloberfläche aufgetragen (vgl. MAURER, 1968).

Auf die übliche Beschwerung der Gesamt-Nukleinsäure-Lösung mit Saccharose wurde verzichtet, um zusätzliches Einschleppen von RNase zu vermeiden, deren Tätigkeit trotz SDS-Zusatzes und Kühlung des Laufpuffers (Eismantel um den Elektrophorese-Topf) nicht auszuschließen war.

Etwa 1/2 Std., nachdem die Färbemittelfront die Gele durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen; die Gele wurden aus den Plexiglasröhrchen geblasen und über Nacht in H_2O-dest. gewaschen. Die Gelmuster wurden bei 265 nm auf einem Chromoscan von JOYCE-LOEBL gemessen, aufgezeichnet und anschließend mit Hilfe eines Planimeters (A. Ott, Kempten) quantitativ ausgewertet. Eine Genauigkeitsprüfung des Planimeters bei Fahrstabeinstellung 10 ergab für 5 unterschiedliche Figuren auf Millimeterpapier eine Standardabweichung von $\pm$ 2 %.

MAK-Elution

Die Säulen (Ø 1 cm, Länge ca. 14 cm) aus methyliertem Rinderserumalbumin mit Kieselgur (Celite 545 Hyflo) wurden nach den Angaben von MANDELL u. HERSHEY (1960) hergestellt; als Puffer wurde der gleiche Puffer wie bei der Elektrophorese (1/5 der Konzentration von Stammlösung 2 in H_2O-dest.) verwendet. Die Nukleinsäure-Fraktionen - Auftrag ca. 15 OD_{260} - wurden mit einem logarithmischen NaCl-Gradienten (0,1M - 1,5M NaCl in Puffer wie oben) eluiert und über einen Fraktionssammler in Fraktionen von 5 ml aufgefangen. Die Gipfelfraktionen (sRNA, DNA, rRNA) wurden bei 260 nm gegen eine Basisfraktion gemessen. Vergleiche von aufgetragenen und eluierten Mengen von Lachssperma-DNA (Serva) ergaben einen

durchschnittlichen Verlust von 10 % ± 4 %. Die eluierte DNA schmolz bei Wärmedenaturierung mit sigmoidem Kurvenverlauf.

DNA-Bestimmung

1 ml der Gesamt-Nukleinsäure-Lösung wurde mit 1 ml 1N NaOH versetzt (RUPPEL u. van WYK, 1965; vgl. ZEIDLER, 1973) und zur Hydrolyse der RNA etwa 16 Std. lang bei 37°C im Wärmebad inkubiert. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Bildung von Phospho-3,4-diester bei Desoxyribosen (sh. BEYERSMANN, 1971) bleibt lediglich die DNA hochmolekular. Nach Abschluß der alkalischen Hydrolyse wurde das Hydrolysat (= 2 ml) mit 2,2 ml vergälltem 96%igem Äthanol, der 0,18 ml Eisessig enthielt, versetzt und gut durchmischt etwa 2 Std. bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach Zentrifugieren (10 Min. bei 5000 UpM, Christ Heraeus UJ II) wurde das Sediment zweimal mit 96%igem Äthanol gewaschen, getrocknet und zur Messung in Puffer sorgfältig gelöst.
Da das Waschen mit Äther den anschließenden Lösungsvorgang erschwerte, wurde dieser letzte Reinigungsschritt unterlassen. Vergleichsbestimmungen mit Lachssperma-DNA ergaben auch bei dieser DNA-Bestimmungsmethode einen Verlust von ca. 10 % ± 5 %. Eine entsprechende Schmelzkurve wie nach MAK-Elution ließ sich nicht aufnehmen; offenbar liegt die DNA im neutralisierten Hydrolysat nicht mehr doppelsträngig vor.

Ribosomale RNA

a) In 10%iger NaCl-Lösung fällt ein Teil der Nukleinsäuren aus. 1 ml des Gesamt-Nukleinsäure-Extraktes wurde versetzt mit 1 ml des Elektrophorese-Puffers (1/5 der Konzentration von Stammlösung 2), der 20 % (Gew./Vol.) NaCl enthält, und bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation (10 Min. bei 5000 UpM, Christ Heraeus UJ II) und Waschen mit Puffer (sh. o.), der 10 % NaCl enthält, wurden die vereinigten Überstände sowie das erneut in Puffer (ohne NaCl) gelöste Sediment bei 260 nm und 310 nm photometrisch gemessen. Überstand und Sediment

erhielten zusammen die eingesetzte Menge an Nukleinsäuren.

Zur Qualitätsbestimmung wurde der gelöste Niederschlag mit Hilfe der MAK-Elution (sh. dort) und durch Auftrennung mit der Gel-Elektrophorese (2,4%ige Gele) als rRNA identifiziert. (Abb. 2 - S. 11 -) Die Peaks, die im Gelmuster neben den rRNA-Gipfeln auftreten, sind als Abbauprodukte besonders der cytoplasmatischen rRNA-Fraktionen anzusehen.

Da der rRNA-Niederschlag quantitativ weiter untersucht werden sollte, wurde die rRNA im folgenden indirekt als Differenz der eingesetzten Gesamt-Nukleinsäuren und der Messung des NaCl-Überstandes ermittelt.

b) Der gelöste rRNA-Niederschlag aus der NaCl-Fällung wurde zur Nukleotidbestimmung 16 Std. bei 37°C in KOH hydrolysiert (gleiche Volumen puffergelöster rRNA und 1N KOH). Nach Neutralisation des alkalischen Hydrolysates mit konzentrierter $HClO_4$ (vgl. RUPPEL, 1964) und Abzentrifugieren des $KClO_4$-Niederschlags (5 Min. Tischzentrifuge) ist der Überstand zur Fraktionierung der rRNA-Nukleotide quantitativ auf eine Dowex-Säule (DOWEX-1 x 4, 200 - 400 mesh, Cl-Form; ca. 1,5 cm x 15 cm) übertragen und mittels aufsteigendem HCl-Gradienten eluiert worden (Mischgefäß: dest-H_2O; Vorratsgefäß: 60 ml 0,05N HCl, dann ca. 300 ml 0,1N HCl). Die Nukleotide wurden in 5 ml-Portionen aufgefangen, durch ihre Absorptionsverhältnisse bei 250 nm und 280 nm identifiziert, bei 260 nm im Photometer gemessen und durch Verrechnung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten bei 260 nm (vgl. RAUEN, 1964) quantitativ bestimmt. Die Nukleotide werden in der Reihenfolge CMP-AMP-GMP-UMP eluiert.

Die Nukleotidmengen der einzelnen Gipfel werden angegeben in Mol-Prozent (Mol%) und bezogen auf die Summe der Nukleotidmenge (CMP + AMP + GMP + UMP) = 100 %.

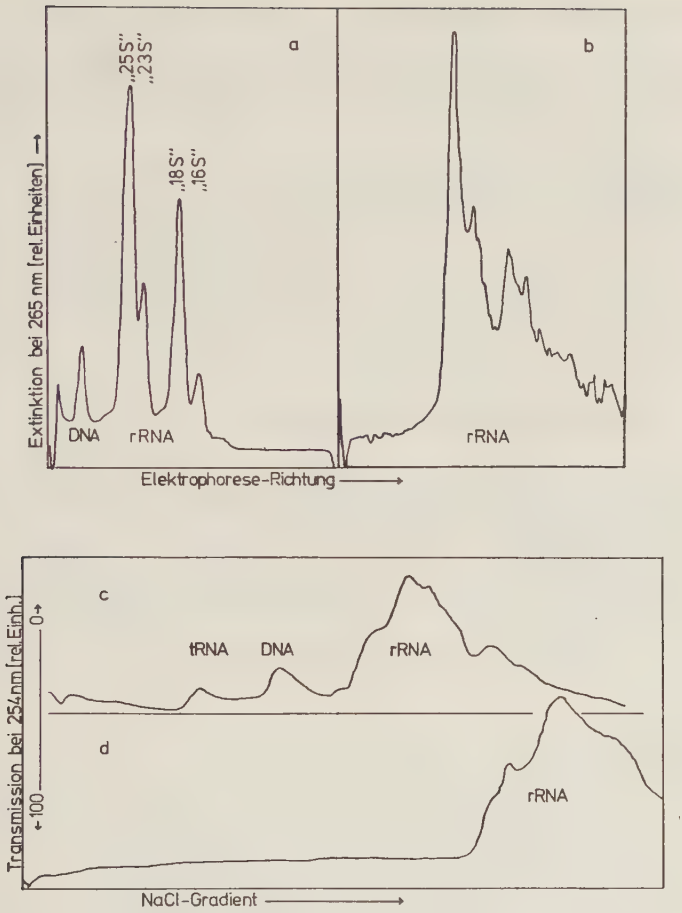

Abb. 2 Scan-Muster nach elektrophoretischer Auftrennung eines Gesamt-Nukleinsäure-Extraktes (a) bzw. der daraus ausgefällten rRNA (b) an 2,4%igen Polyacrylamid-Gelen sowie Elutionsprofile eines Gesamt-Nukleinsäure-Extraktes (c) und daraus ausgefällter rRNA (d) nach Chromatographie an der MAK-Säule. Nukleinsäuren aus Primärblättern 168 Std. (a/b) oder 144 Std. (c/d) alter, etiolierter Bohnenkeimlinge mit Wurzel.

Hydrolyse der Gesamt-RNA

0,5 ml der Gesamt-Nukleinsäure-Lösung wurden,wie für die rRNA beschrieben, mit KOH hydrolysiert, an der DOWEX-Säule fraktioniert und ausgewertet.

Protein- und Enzymbestimmungen

Für die Bestimmung von löslichem Protein sowie der Enzyme, die zusammengefaßt zitiert werden (sh. III./A des Ergebnisteils), wurden bei PAUL (1970) die Testvorschriften wie bei FEIERABEND (1965) angegeben übernommen.

4. Auswertung der Untersuchungen

Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus je 4 Ansätzen; zwischen den Materialanzuchten der Ansätze verging etwa 1/4 Jahr.
Die statistischen Berechnungen beruhen auf der t-Tafel sowie den Formelangaben für Standardabweichung, p und totales P bei PÄTAU (1943).

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Die Wirkung von Cytokininen auf das Enzymmuster in etiolierten Primärblättern

Nachfolgend sind die Ergebnisse aus enzymatischen Untersuchungen an Primärblättern der Bohne (PAUL, 1970) zusammengefaßt, mit denen die Veränderungen auf dem Niveau der Nukleinsäuren verglichen werden sollen:

1. Eine Einschränkung des Cytokinin-Angebotes durch Entfernung der Wurzel hat bei etiolierten Keimlingen bis 168 Std. nach Keimungsbeginn keine Wirkung auf die Enzymaktivitäten der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und der 6-Phospho-Gluconsäure-Dehydrogenase (6PGSDH).
2. Demgegenüber begrenzt Cytokinin-Mangel vom 5. Keimungstag an die Zunahme der absoluten Enzymaktivitäten von Carboxydismutase (RuDPCO) und Triosephosphat-Dehydrogenase (TPNabh. GAPDH), die als Leitenzyme der Plastidenentwicklung gemessen wurden.
3. Wurzelverlust limitiert in den Primärblättern nach 6 Tagen Keimung erstmals den Zuwachs an löslichem Protein.
4. Gegenüber 168 Std. alten Normalkeimlingen (0,73 mg lösl. Protein/Primärblatt) ist die Proteinsynthese in Primärblättern wurzelloser Keimlinge gleichen Alters deutlich eingeschränkt (0,41 mg lösl. Protein/Primärblatt); die Wirkung der Wurzel läßt sich durch Applikation von 10^{-4} g/ml Kinetin (mit Tween) ersetzen, das sogar über die normale Proteinsynthese hinaus stimuliert (0,95 mg lösl. Protein/Primärblatt).
   0,01%ige Tween20-Lösung, allein auf die Primärblätter appliziert, verändert die allgemeine Proteinsynthese nicht signifikant (0,48 mg lösl. Protein/Primärblatt).
5. Die nachfolgende tabellarische Übersicht beschreibt die Auswirkungen normaler und verminderter Cytokinin-Versorgung sowie der Applikation von Kinetin (6FAP) und Tween20

auf die Enzymaktivitäten in Primärblättern von 168 Std. alten Keimlingen.

Tab. 1: Absolute Aktivitäten (nmol/min x Primärblatt) einiger Enzyme in Primärblättern 168 Std. alter, etiolierter Keimlinge mit und ohne Wurzel und bei wurzellosen Keimlingen, denen nach 100 Std. Keimung 10^{-4} g/ml Kinetin zusammen mit Tween20 (0,01 %) als Netzmittel oder nur Tween-Lösung appliziert worden war. Anzucht bei 22°C im Dunkeln.

Keimlinge mit Wurzel	ohne Wurzel	ohne Wurzel	ohne Wurzel
Applikation:	-	+ Tween20	+ Kinetin/ Tween20
Enzyme:			
G6PDH	20,7	11,8	30,6
6PGSDH	41,0	29,1	59,2
TPNabh. GAPDH	121,7	72,1	104,2
RuDPCO	9,4	7,5	13,4

Tabelle aus: PAUL (1970), Seite 17, verändert.

B. Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt der Primärblätter

Durch die Veränderungen im Gehalt an Protein (lösl. Protein/ Primärblatt) wird die allgemeine Situation der Enzymsynthesen beschrieben; entsprechend unspezifisch drückt die Produktion an Gesamt-Nukleinsäuren/Primärblatt das Ausmaß von Prozessen aus, welche u. a. die Enzymsynthesen ermöglichen.

120 Std. nach Keimungsbeginn wirkt sich eine verminderte Cytokinin-Versorgung der Primärblätter erstmals nachteilig auf die Nukleinsäure-Produktion aus: wurde den etiolierten

Keimlingen nach 50 Std. die Wurzel entfernt, so nimmt zwischen dem 4. und 5. Keimungstag der Nukleinsäure-Gehalt der Primärblätter um lediglich 11 % zu, bei vollständigen Keimlingen dagegen um 49 %. Die Differenz der Gesamt-Nukleinsäure-Produktion vergrößert sich mit zunehmendem Alter: in Primärblättern vollständiger Keimlinge wird der Nukleinsäure-Gehalt von 96 Std. bis 168 Std. um den Faktor 3,3 vermehrt, bei wurzellosen hingegen nur um den Faktor 2,1.

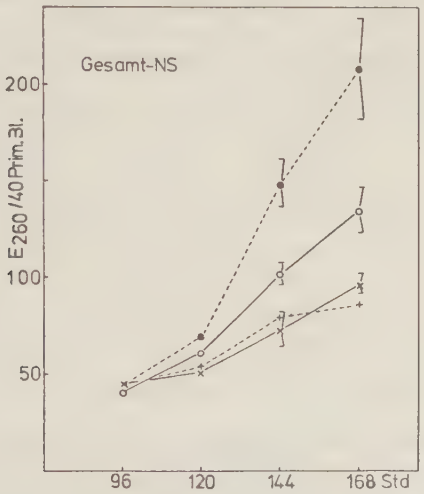

Abb. 3 Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt in Primärblättern von etiolierten Keimlingen mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzellosen Keimlingen nach Applikation von Kinetin/Tween-(•) oder Tween-Lösung (+).

Kinetin (10^{-4} g/ml + 0,01 % Tween) behebt die nach Wurzelverlust beobachtete Einschränkung der normalen Nukleinsäure-Produktion nicht nur unmittelbar, sondern stimuliert zwischen 96 Std. und 168 Std. die Zunahme an Gesamt-Nukleinsäure in den Primärblättern wurzelloser Keimlinge stärker als bei denen von Normalkeimlingen um den Faktor 4,6.
Die Behandlung mit 0,01%iger Tween-Lösung allein, der die

Primärblätter wurzelloser Keimlinge nach 100 Std. unterzogen wurden, beeinflußt die Zunahme des Nukleinsäure-Gehaltes nicht.

Der Vergleich der täglichen prozentualen Zuwachsraten bei unterschiedlicher Vorbehandlung (Tab. 2) der Keimlinge bestätigt den Bedarf an Cytokininen für die Gesamt-Nukleinsäure-Bildung.

Tab. 2: Steigerungsrate des Gesamt-Nukleinsäure-Gehaltes in Primärblättern von jeweils unterschiedlich behandelten Keimlingen als prozentuale Zunahme gegenüber dem Vortag = 100 %.

Keimlinge mit Wurzel Applikation:	ohne Wurzel -	ohne Wurzel -	ohne Wurzel + Tween20	ohne Wurzel + Kinetin/ Tween20
Alter:				
120	+ 49	+ 11	+ 21	+ 54
144	+ 70	+ 46	+ 45	+ 113
168	+ 31	+ 32	+ 11	+ 40

Unabhängig von der jeweiligen Keimlingsbeschaffenheit wird zwischen dem 5. und 6. Keimungstag die höchste Zuwachsrate beobachtet. Offenbar beeinflußt die Cytokinin-Versorgung nicht den Zeitpunkt größter Syntheseaktivität, bestimmt aber das Ausmaß, in dem Nukleinsäuren während des vorgegebenen genetischen Programms gebildet werden.

C. DNA der Primärblätter

Da die extranukleare DNA einen relativ geringen Anteil ausmacht - Erfahrungswerte für plastidäre und mitochondriale DNA liegen unter 5 % der Gesamt-DNA (SPREY u. GIETZ, 1973) - bedeutet DNA-Vermehrung überwiegend Replikation von Kern-DNA. Die DNA-Menge ist also ein Maß für die Häufigkeit von Mitosen

bzw. Endomitosen. Unter der Voraussetzung, daß nur begrenzt Polyploidie induziert wird, kann aus einer DNA-Erhöhung auch auf eine Zunahme der Zellzahl/Primärblatt geschlossen werden.

Um falschen Aussagen, die aus Mängeln der Aufarbeitung resultieren, möglichst sicher zu begegnen (vgl. ZEIDLER, 1973), wurde die Gesamt-DNA nach Trennung mittels MAK-Chromatographie (Abb. 4a) und nach Fällung aus neutralisierten NaOH-Hydrolysaten (Abb. 4b) bestimmt.

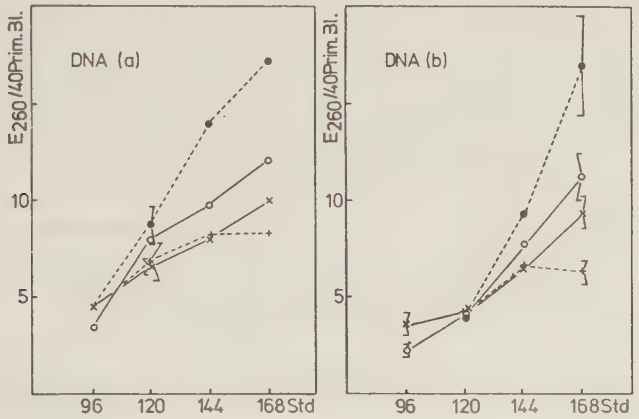

Abb. 4 DNA-Gehalt in Primärblättern von etiolierten Keimlingen mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzellosen Keimlingen nach Applikation von Kinetin/Tween- (●) oder Tween-Lösung (+).
Bestimmungen aus Eluaten der MAK-Chromatographie (a) und nach Hydrolyse der RNA mit NaOH (b).

1. Vergleich der DNA-Bestimmungsmethoden

Aufgrund der beobachteten Schmelzkurven ist anzunehmen, daß die DNA nach Fällung aus dem Hydrolysat denaturiert und einsträngig, nach Elution von der MAK-Säule dagegen zumindest teilweise in der nativen Doppelstrangform vorliegt (sh. methodischer Teil). Wegen der höheren optischen Dichte von

teildenaturierter DNA wäre zu erwarten, daß die DNA-Bestimmungen aus den MAK-Eluaten generell niedriger ausfallen als bei der Hydrolysemethode. Wie erklärt sich der Widerspruch zu den tatsächlichen Befunden?

Durch den aufsteigenden NaCl-Gradienten wird die Bindung zwischen dem methylierten Rinderserumalbumin der MAK-Säule und der jeweiligen Nukleinsäure-Fraktion gelöst.
Die NaOH dagegen hydrolysiert alle jene Nukleinsäuren, deren Pentosephosphate eine 3,4Phospho-di-ester-Bindung zulassen, also alle Poly-Ribonukleotide.

Die Abweichungen der beiden DNA-Bestimmungen (bei wurzellosen 120 Std. alten Keimlingen bis zu 50 %;mit p=0,02) könnten daher auf Nukleinsäure-Fraktionen zurückgeführt werden, die zusammen mit der DNA von der MAK-Säule eluiert werden, andererseits aber die alkalische Hydrolyse nicht überstehen (z. B. DNA-abh. RNA, mRNA o. a.).

Nach 168 Std. werden dann vergleichbare DNA-Mengen pro Primärblatt gemessen; lediglich bei Tween-behandelten Keimlingen liegen die DNA-Werte der Hydrolysemethode noch um 27 % unter denen der MAK-Auftrennung.

2. DNA-Gehalt pro Primärblatt während der Keimlingsentwicklung

Bei 96 Std. alten Keimlingen betragen die mit der Hydrolysemethode ermittelten DNA-Werte von Primärblättern vollständiger Keimlinge etwa 64 % und die von Primärblättern wurzelloser Keimlinge etwa 78 % der DNA-Menge, die bei Auftrennung an der MAK-Säule gemessen werden. Übereinstimmend enthalten jedoch nach beiden Bestimmungsmethoden die Primärblätter wurzelloser Keimlinge im Alter von 4 Tagen mehr DNA als bei vollständigen Pflanzen. Wenn dieser Unterschied statistisch auch nicht sicher ist (p=0,2 für die DNA-Bestimmung aus dem Hydrolysat), so sprechen doch die generell in allen Einzelbestimmungen bei Normalkeimlingen niedriger ausfallenden DNA-Werte für eine nicht zufällige Abweichung.

Während sich den Ergebnissen der MAK-Chromatographie zufolge zwischen 96 Std. und 120 Std. eine Stimulierung der DNA-Synthese durch Kinetin andeutet, läßt sich ein vergleichbarer Effekt mit Hilfe der Hydrolysemethode erst nach 120 Std. Keimung nachweisen. Entsprechend ist in diesem Falle (Abb.4b) erst später eine verminderte DNA-Synthese bei Cytokinin-Mangel zu beobachten.
Gegenüber wurzellosen Pflanzen ist bei natürlicher Cytokinin-Versorgung durch die Wurzel nach 168 Std. der DNA-Gehalt pro Primärblatt um etwa 20 % erhöht. Die Applikation von Kinetin mit Tween bewirkt dagegen bis zum gleichen Zeitpunkt, daß die Primärblätter wurzelloser Keimlinge durchschnittlich 80 % mehr DNA aufweisen. Tatsächlich ist die Förderung durch Kinetin noch höher einzuschätzen, weil der DNA-Gehalt cytokininverarmter Primärblätter nach Behandlung mit Tween-Lösung allein um etwa 40 % vermindert wird.
Nach Aussage beider Methoden nimmt die DNA bei wurzellosen, mit und ohne Tween behandelten Keimlingen bis zum Alter von 144 Std. zu. Desgleichen übereinstimmend sprechen die Befunde dafür, daß während der nächsten 24 Std. in cytokininverarmten Primärblättern, denen Tween-Lösung appliziert worden war, die weitere DNA-Nettosynthese stagniert.

Die Unterschiede im DNA-Gehalt von Primärblättern normaler und wurzelloser Keimlinge während der Entwicklung von 96 Std. bis 168 Std. sind statistisch nicht gesichert. Signifikant ist dagegen, daß die DNA-Bildung in den Primärblättern deutlich mehr durch Kinetin als durch das Cytokinin der Wurzel gefördert wird und daß der Einfluß von Tween die DNA-Zunahme nach 144 Std. hemmt ($p = 0{,}016$).

3. Prozentualer Anteil der DNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt

a) Abhängigkeit von der Keimungsdauer

Je nach Art der DNA-Bestimmung (vgl. S. 17) unterscheiden sich während der Primärblattentwicklung die prozentualen Anteile der DNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt. Aufgrund der

DNA-Mengen, die nach Fällung aus dem Hydrolysat (Abb. 5b) bestimmt wurden, steigt der prozentuale Anteil der DNA außer für Tween-behandelte Primärblätter wurzelloser Keimlinge während des untersuchten Entwicklungszeitraumes gleichmäßig an. Wenn dagegen die DNA-Bestimmungen aus den MAK-Eluaten zugrundeliegen (Abb. 5a), erreicht der relative DNA-Anteil in 120 Std. alten Primärblättern ein Maximum und fällt dann während der nächsten 48 Std. in etwa wieder auf das Niveau zurück, das sich für 96 Std. alte Primärblätter errechnet.

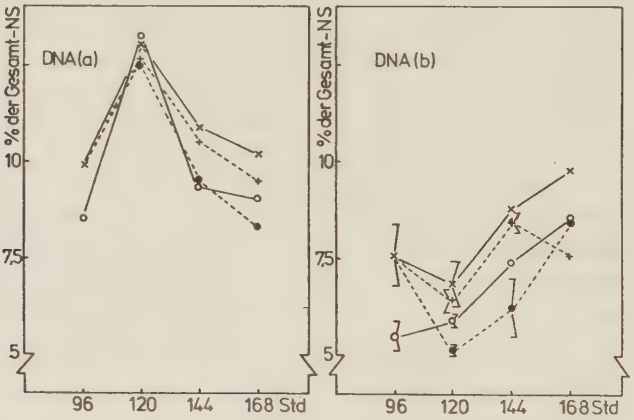

Abb. 5 Prozentualer Anteil der DNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt von Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (•) oder Tween-Lösung (+).
DNA-Bestimmungen aus Eluaten der MAK-Chromatographie (a) und nach Hydrolyse der RNA mit NaOH (b).

Wegen der Schwankungsbreite des prozentualen DNA-Anteils an der Gesamt-Nukleinsäure-Menge besonders dann, wenn die Ergebnisse auf DNA-Bestimmungen aus MAK-Eluaten basieren, kann das Maximum der DNA-Anteile in 120 Std. alten Primärblättern jedoch nicht als gesichert angesehen werden.

b) Abhängigkeit von der Behandlung der Keimlinge

Die Frage, inwieweit der prozentuale Anteil der DNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt von der Keimlingsbeschaffenheit abhängt, wird trotz divergierender Angaben der beiden Bestimmungsmethoden über den absoluten DNA-Gehalt der Primärblätter vergleichbar beantwortet. Da aber die Befunde bei Berechnung aus den DNA-Mengen nach der Hydrolyse-Fällung wegen der allgemein geringeren Abweichungen besser gesichert sind, orientiert sich die folgende Darstellung an den Aussagen von Abbildung 5b, Seite 20.

Primärblätter 96 Std. alter Keimlinge mit Wurzel enthalten im Mittel prozentual weniger DNA als cytokininverarmte ($p = 0{,}05$). Der Effekt der unterschiedlichen Cytokinin-Versorgung bei wurzellosen und vollständigen Keimlingen kann nach 120 Std. Keimung nicht mehr sicher nachgewiesen werden. Dagegen ist bis zum gleichen Zeitpunkt (120 Std.) der DNA-Anteil am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt nach Kinetin-Applikation auf Primärblätter wurzelloser Keimlinge signifikant niedriger als bei normaler Cytokinin-Versorgung durch die Wurzel ($p = 0{,}014$). Bei 168 Std. alten Keimlingen führt Cytokinin-Mangel - gemessen am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt - zu prozentual höheren DNA-Anteilen, und nach Kinetin-Applikation auf Primärblätter wurzelloser Keimlinge wird das DNA-RNA-Verhältnis von Normalkeimlingen wieder hergestellt.
Die generelle Tendenz, daß eine bessere Cytokinin-Versorgung der Primärblätter zu vermindertem prozentualem DNA-Gehalt führt, kann während des gesamten untersuchten Entwicklungszeitraumes beobachtet werden.
Die Behandlung mit einer Lösung von Tween20 allein, das bei jeder Kinetin-Applikation als Netzmittel verwendet wurde, beeinflußt den relativen DNA-Gehalt erst nach 144 Std. Keimung. Formal ähnelt der Tween-Effekt in 168 Std. alten cytokininverarmten Primärblättern insofern der Wirkung von Cytokininen, als bereits die Behandlung mit dem Netzmittel allein

den prozentualen DNA-Anteil an der Gesamt-Nukleinsäure-Menge vermindert.

D. Veränderungen im sRNA-Gehalt

Die mit etwa 75 Nukleotiden kleinste funktionelle Einheit, die tRNA, wird als erste Nukleinsäure-Fraktion von der MAK-Säule eluiert. BURKARD et al (1972) berichten von Änderungen im Gehalt aminosäure-spezifischer tRNA-Spezies während der Plastidenmorphogenese bei Phaseolus. Da die Rate des Aminosäure-Einbaus in vitro unter anderem durch die verfügbare tRNA-Menge regulierbar ist (ERBEN, 1967), könnten auch in vivo quantitative Änderungen des tRNA-Gehaltes der Primärblätter für die Effekte der Keimlingsbehandlungen auf die allgemeine Proteinsynthese verantwortlich sein. Eine Aussage über die tatsächliche tRNA-Menge/Primärblatt kann nur bedingt gemacht werden, da sich bei der MAK-Chromatographie die Fraktionen tRNA und 5S-RNA überlappen. Die im folgenden abgehandelte Fraktion wird daher exakter als sRNA bezeichnet.

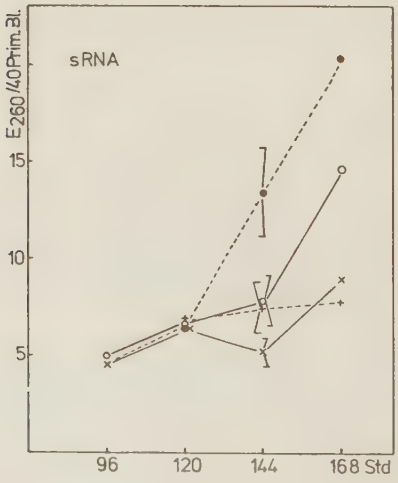

Abb. 6

sRNA-Gehalt in Primärblättern von etiolierten Keimlingen mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzellosen Keimlingen nach Applikation von Kinetin/Tween- (●) bzw. Tween-Lösung (+).

Während der ersten beiden Untersuchungstage nimmt die sRNA-Menge bei allen Keimlingen gleichermaßen um 30 - 40 % zu. Das unterschiedliche Cytokinin-Angebot beeinflußt den sRNA-Gehalt also in frühen Primärblatt-Stadien nicht. Während sich auch für Primärblätter von vollständigen sowie wurzellosen, 144 Std. alten Keimlingen ein abweichender sRNA-Gehalt nicht sicher belegen läßt, wird nach Applikation von Kinetin/Tween die Bildung der sRNA schon deutlich vom 5. Keimungstag an stimuliert. Inwieweit die Kinetin/Tween-Applikation den Zeitpunkt der erhöhten sRNA-Synthese vorverlegt oder lediglich die Steilheit des Anstiegs beeinflußt, kann nicht entschieden werden.
Nach 168 Std. Keimung weisen Primärblätter von Normalkeimlingen etwa die 1,5-fache sRNA-Menge von cytokininverarmten auf; Primärblätter wurzelloser Keimlinge, denen Kinetin/Tween appliziert worden war, enthalten vergleichsweise mehr als doppelt soviel sRNA wie unbehandelte. Tween-Lösung allein wirkt sich nicht aus.

E. rRNA-Gehalt der Primärblätter

Ein Großteil der insgesamt extrahierten Nukleinsäure-Menge fällt in 10%iger NaCl-Lösung aus. Diese hochmolekulare Fraktion, die durch Elution von der MAK-Säule und aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit als rRNA identifiziert wurde (sh. methodischer Teil), prägt daher maßgeblich das Bild der Gesamt-Nukleinsäure-Zunahme.

1. Veränderungen im Anteil fällbarer rRNA an der Gesamt-Nukleinsäure-Menge

Auffallend gering ist bei 96 Std. alten Keimlingen der Anteil der rRNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt der Primärblätter. Von nur 50 % erhöht sich zwischen dem 4. und 5. Keimungstag der relative rRNA-Anteil bei allen Keimlingen signifikant auf 60 - 70 % (für Normalkeimlinge: $p = 0{,}002$) und

steigt dann im weiteren Entwicklungsverlauf bis 168 Std. nur noch geringfügig auf ungefähr 75 % des Gesamt-Nukleinsäure-Gehaltes an.

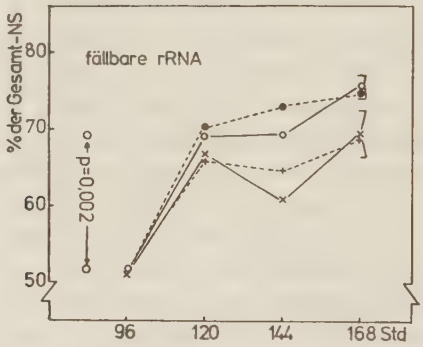

Abb. 7 Prozentualer Anteil fällbarer rRNA am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt von Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) oder bei wurzellosen Keimlingen nach Applikation von Kinetin/Tween- (•) bzw. Tween-Lösung (+).
Abweichung der mittleren prozentualen rRNA-Gehalte nach 96 Std. und nach 120 Std. Dunkelkeimung bei vollständigen Keimlingen: p = 0,002.

In Primärblättern 96 Std. alter Keimlinge mit oder ohne Wurzel sind prozentual gleiche rRNA-Anteile nachweisbar; während der weiteren Entwicklung wird dann bei cytokininverarmten Primärblättern leicht zunehmend die Tendenz zu verminderten rRNA-Anteilen beobachtet. Nach 168 Std. Keimung entsprechen sich die prozentualen rRNA-Anteile am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt bei Primärblättern von cytokininverarmten Keimlingen mit und ohne Tween-Behandlung ebenso wie bei Primärblättern von Normalkeimlingen bzw. von wurzellosen Keimlingen, denen Kinetin/Tween appliziert worden war. Jedoch kann nicht signifikant nachgewiesen werden, daß Cytokinine die rRNA relativ mehr fördern als die Gesamt-Nukleinsäure-Menge.

2. Abhängigkeit der rRNA-Menge pro Primärblatt von der Cytokinin-Versorgung

Absolut wird der rRNA-Gehalt, auf den sich in 96 Std. alten Primärblättern der Verlust der Wurzel noch nicht ausgewirkt hat, vom 4. - 7. Keimungstag bei vollständigen Keimlingen auf das 4,9-fache erhöht, bei wurzellosen lediglich um den Faktor 2,9.

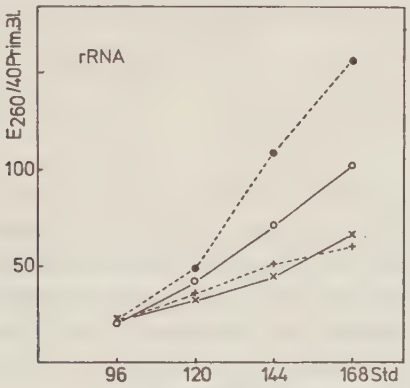

Abb. 8 rRNA-Gehalt in Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (•) bzw. Tween-Lösung (+).

Im gleichen Zeitraum erreicht die rRNA-Menge in Primärblättern wurzelloser Keimlinge, denen Kinetin/Tween appliziert worden war, mehr als das 6,6-fache des Ausgangswertes. Auf den absoluten rRNA-Gehalt cytokininverarmter Primärblätter wirkt sich eine Behandlung mit Tween-Lösung ebensowenig aus wie auf den prozentualen Anteil der rRNA (sh. Seite 24).

Um zu klären, mit welchem zeitlichen Abstand und mit welcher Intensität sich Cytokinin-Verarmung und Kinetin-Applikation im rRNA-Gehalt der Primärblätter bemerkbar machen, werden in Tab. 3 die rRNA-Mengen von Primärblättern ent-

sprechend behandelter Keimlinge und gleichaltriger Normalkeimlinge verglichen.

Tab. 3: rRNA-Gehalt in Primärblättern wurzelloser (oW), Tween-(oW-T) oder Kinetin/Tween-(oW-Kin-T) behandelter Keimlinge, bezogen auf den rRNA-Gehalt bei gleichaltrigen Normalkeimlingen (mW) = 100 %.

Alter (Std.)	mW	oW	oW-T	oW-Kin-T
96	100	112		
120	100	83	90	116
144	100	72	77	145
168	100	72	65	155

Wurde bei 50 Std. alten Keimlingen die Wurzel abgeschnitten, so bewirkt die erwartete Cytokinin-Verarmung erst nach 3 weiteren Keimungstagen eine verminderte Zunahme an rRNA. Das relative Niveau des Zuwachses gegenüber Normalkeimlingen (etwa 75 %) bleibt dann während des untersuchten Entwicklungszeitraumes konstant.
Nach Kinetin-Applikation auf cytokininverarmte Primärblätter von 100 Std. alten Keimlingen wird dagegen der rRNA-Gehalt unmittelbar erhöht und steigt relativ zur Kontrolle (oW-T) während der weiteren Entwicklung noch an.

F. Quantitativer Vergleich der rRNA mit anderen Nukleinsäure-Fraktionen

1. rRNA/sRNA-Verhältnis

Es soll überprüft werden, ob sich der Quotient rRNA/sRNA während der Entwicklung der Primärblätter verändert und darüber hinaus, wie sich eine unterschiedliche Versorgung der Primärblätter mit Cytokininen auf das rRNA/sRNA-Verhältnis auswirkt.

Tab. 4: Quantitativer Vergleich rRNA/sRNA von jeweils 40 Primärblättern nach unterschiedlicher Keimlingsbehandlung.
mW = Keimlinge mit Wurzel, oW = ohne Wurzel,
oW-T = wurzellose Keimlinge nach Tween- und
oW-Kin-T = nach Kinetin/Tween-Applikation.

Alter (Std.)	mW	oW	oW-T	oW-Kin-T
96	4,63±0,34	5,92±0,43		
120	6,55	6,88	5,71	7,99
144	9,86	8,53	7,72	8,97
168	7,86	8,10	8,08	8,63

Bezogen auf den Gehalt an sRNA ist in Primärblättern 96 Std. alter Keimlinge etwa die 5-fache Menge an rRNA nachzuweisen; bei wurzellosen entfallen im Mittel 6 rRNA-Anteile auf eine sRNA-Einheit. Nach 168 Std. Keimung enthalten die Primärblätter entsprechende Nukleinsäure-Fraktionen im Verhältnis 8:1.
Aus den Befunden (Tab. 4) geht hervor, daß der Gehalt an rRNA zumindest bis zum 6. Tag nach Keimungsbeginn schneller zunimmt als der sRNA-Gehalt. Das Verhältnis, in dem rRNA und sRNA nachweisbar sind, hängt nicht signifikant vom Cytokinin-Angebot in den Primärblättern ab.

2. Verhältnis der rRNA- und DNA-Zunahme in anzuchtgleichen Primärblättern

Es konnte gezeigt werden, daß während der Entwicklung der Primärblätter sowohl der Zuwachs an rRNA als auch an DNA durch das Cytokinin-Angebot kontrolliert wird(vgl. Kap. C und E). Anhand der Quotienten aus beiden Fraktionen, die jeweils aus gleichen Gesamt-Nukleinsäure-Extrakten bestimmt wurden, soll geklärt werden, ob rRNA-Gehalt und DNA-Repli-

kation gleichermaßen von der Cytokinin-Versorgung abhängen. Auf die Problematik der DNA-Messungen wurde bereits hingewiesen (vgl. Seite 17). Unter den gegebenen Voraussetzungen sind je nach Bestimmungsmethode auch unterschiedliche Quotienten rRNA/DNA zu erwarten.

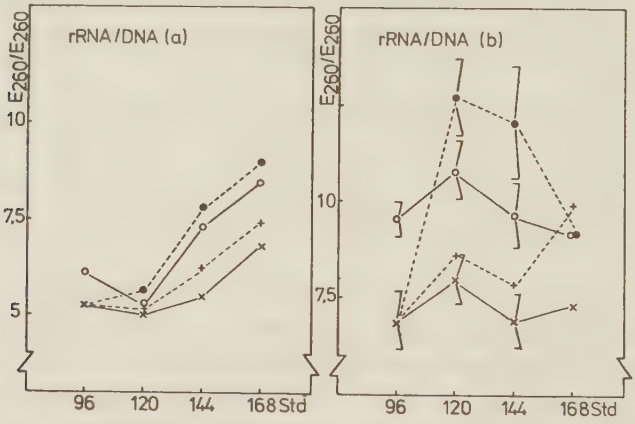

Abb. 9 Mengenverhältnis rRNA/DNA in Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) bzw. wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (●) oder Tween-Lösung (+).
Vergleich des Gehaltes an gefällter rRNA mit dem DNA-Gehalt aufgrund der Bestimmungen aus Eluaten der MAK-Chromatographie (a) oder nach Hydrolyse der RNA mit NaOH (b).

a) Werden die DNA-Werte von MAK-Eluaten zugrundegelegt (Abb. 9a), dann weisen die Primärblätter von 96 Std. und 120 Std. alten Keimlingen gleiche Verhältnisse von rRNA und DNA auf. Im Laufe der weiteren Entwicklung wird pro Genom zunehmend mehr rRNA gebildet. Die Höhe der rRNA-Syntheseleistung, bezogen auf die DNA-Menge, hängt vom Cytokinin-Angebot ab. Cytokinin-Mangel vermindert den Quotienten rRNA/DNA und Kinetin, appliziert mit Tween, fördert das Verhältnis rRNA/DNA mehr als die Wurzel zugunsten des rRNA-Anteils.

b) Auch nach Aussage der rRNA/DNA-Relationen, die auf der DNA-Bestimmung aus den Hydrolysaten basieren (Abb. 9b), führt das verminderte Cytokinin-Angebot bei wurzellosen Keimlingen grundsätzlich zu kleineren rRNA/DNA-Quotienten. Der rRNA-Gehalt pro Genom nimmt aber während der Entwicklung von Primärblättern wurzelloser und vollständiger Keimlinge nicht zu. Hier hat sich bereits nach 4 Tagen Keimung ein Niveauunterschied manifestiert ($p = 0{,}028$), der bis zum 7. Keimungstag erhalten bleibt.
Durch die Applikation von Kinetin/Tween nach 100 Std. Keimung wird der Cytokinin-Mangel in Primärblättern wurzelloser Keimlinge unmittelbar behoben; der zugehörige Quotient rRNA/DNA übersteigt aber nur zwischenzeitlich den vor Normalkeimlingen.
Bis 144 Std. nach Keimungsbeginn beeinflußt die Behandlung mit Tween-Lösung das rRNA/DNA-Verhältnis in cytokininverarmten Primärblättern nicht signifikant. Danach erhöht sich der rRNA-Gehalt pro Genom jedoch auffallend auf das für Normalkeimlinge typische Verhältnis.

c) Eine weitere, von den bisher beschriebenen Methoden unabhängige Bestimmung der rRNA/DNA-Quotienten basiert auf der Auswertung von Scan-Mustern der Elektrophorese, bei der die Gesamt-Nukleinsäuren an 2,4%igen Polyacrylamid-Gelen in DNA- und rRNA-Banden aufgetrennt werden. Für den Vergleich der planimetrisch bestimmten Flächen unter den Gipfeln (sh. methodischer Teil) bietet sich als Bezugsgröße für die rRNA das jeweilige Verhältnis zum DNA-Peak an.

Auch bei solchermaßen bestimmten Verhältnissen (sh. Abb. 10, Seite 30) enthalten cytokininverarmte Primärblätter relativ zum DNA-Gehalt weniger rRNA. Desgleichen erreicht der Quotient rRNA/DNA unmittelbar nach der Kinetin/Tween-Applikation einen Wert, der im Mittel über dem von Normalkeimlingen liegt.

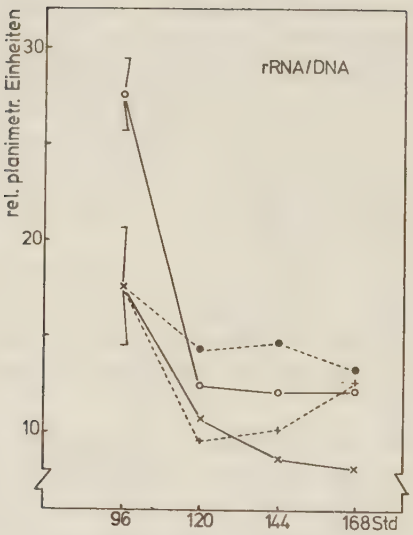

Abb. 10 Mengenverhältnis rRNA/DNA aufgrund planimetrischer Auswertung der Elektrophorese-Trennmuster von Gesamt-Nukleinsäure-Extrakten aus Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) sowie von wurzellosen Keimlingen nach Applikation von Kinetin/Tween- (•) oder Tween-Lösung (+).

Vergleichbar mit der Aussage der rRNA/DNA-Verhältnisse, die auf Meßwerten von NaCl-Fällungen der rRNA und Hydrolysat-Fällungen der DNA beruhen, erhöht auch hier bereits die Applikation von Tween-Lösung in cytokininverarmten Primärblättern den Quotienten rRNA/DNA.

Die divergierenden Befunde über den zeitlichen Verlauf der Veränderungen des rRNA/DNA-Verhältnisses während der Entwicklung werden hier noch um eine dritte Version bereichert: in Primärblättern von Keimlingen mit und ohne Wurzel wird der rRNA-Gehalt pro Genom zwischen dem 4. und 5. Keimungstag vermindert.

d) Trotz der zum Teil abweichenden Aussagen über die Änderung der rRNA/DNA-Verhältnisse während der Entwicklung stimmen die Quotienten für Primärblätter entsprechender, 168 Std. alter Keimlinge gut überein. Die folgende tabellarische Zusammenfassung der unterschiedlich bestimmten Quotienten soll diesen Befund noch einmal verdeutlichen.

Tab. 5: Vergleich der Quotienten rRNA/DNA für 168 Std. alte Primärblätter: die durch 10%ige NaCl-Lösung fällbare rRNA-Menge wird bezogen auf den DNA-Gehalt nach Bestimmung aus MAK-Eluaten (1) oder aus der alkalischen Hydrolyse (2). Außerdem ist das Verhältnis rRNA/DNA planimetrisch (3) aufgrund der elektrophoretischen Auftrennung an Polyacrylamid-Gelen bestimmt worden.

Verhältnis rRNA/DNA:	(1)	(2)	(3)
Keimlinge:			
mit Wurzel	8,4	9,1	12,2
ohne Wurzel	6,8	7,3	8,3
ohne Wurzel + Tween	7,4	9,9	12,4
ohne Wurzel + Kinetin/Tween	9,0	9,1	13,4

Besonders hingewiesen wird hier noch einmal auf den Effekt, den die Behandlung mit Tween-Lösung in cytokininverarmten Primärblättern wurzelloser Keimlinge hervorruft. Der Tendenz nach erhöht die Applikation von Tween-Lösung den Quotienten rRNA/DNA während der gesamten Primärblattentwicklung, aber erst gegen Ende des Untersuchungszeitraumes wird das rRNA/DNA-Verhältnis von Normalkeimlingen erreicht.

Aufgrund der Abweichungen sowie der jeweils höheren Mittelwerte bei 168 Std. alten wurzellosen Keimlingen mit Tween-Behandlung gegenüber wurzellosen, unbehandelten kann mit 95%iger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß Tween-Lösung die Ausstattung mit rRNA pro DNA - möglicherweise auch pro Zelle - formal ähnlich erhöht wie Cytokinine.

G. Fraktionen der rRNA

Die rRNA trennt sich bei der Elektrophorese an 2,4%igen Polyacrylamid-Gelen in 4 Komponenten auf: in eine größere und kleinere cytoplasmatische sowie eine schwerere und leichtere plastidäre Fraktion (vgl. Scan-Muster Seite 11). Die Densitogramme wurden planimetriert und die Fläche unter entsprechenden rRNA-Peaks auf die des zugehörigen DNA-Gipfels bezogen.
Im Hinblick auf den Vergleich mit Aktivitätsänderungen bei cytoplasmatischen und plastidären Leitenzymen soll untersucht werden, wie sich Veränderungen in der Cytokinin-Versorgung auf den Gehalt an cytoplasmatischer und plastidärer rRNA auswirken.

1. Unterfraktionen von jeweils cytoplasmatischer und plastidärer rRNA

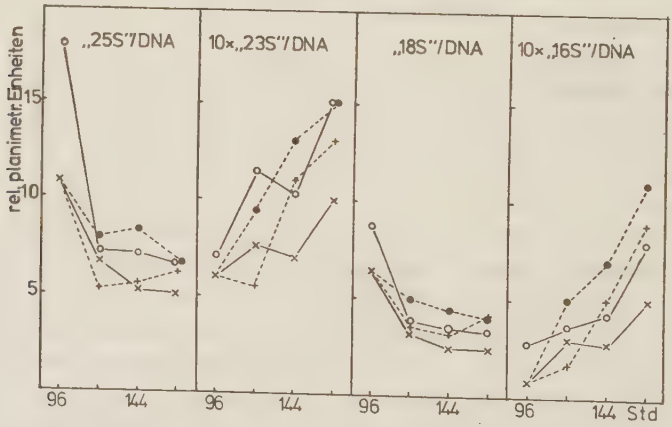

Abb. 11 Gehalt an cytoplasmatischer "25S" bzw. "18S" rRNA sowie an plastidärer "23S" bzw."16S" rRNA relativ zum DNA-Gehalt (= 1) in Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (●) bzw. Tween-Lösung (+).
Planimetrische Auswertung der Scan-Muster nach elektrophoretischer Auftrennung von Gesamt-Nukleinsäure-Extrakten.

Die cytoplasmatischen Untereinheiten sind den in der Literatur als "25S" und "18S" beschriebenen zuzuordnen, die plastidären der "23S" und der "18S" (LOENING, 1967; REISNER et al, 1968; SCOTT et al, 1971).
Die schwereren und leichteren Nukleinsäure-Komponenten einer Ribosomensorte verhalten sich in der Tendenz während der Primärblattentwicklung gleichartig. Für den Quotienten aus den Anteilen der großen und kleinen Untereinheit von jeweils cytoplasmatischer bzw. plastidärer rRNA in vivo wird bei INGLE (1968) der Wert 2 angegeben.
Im folgenden wird geprüft, wie sich bei Primärblättern der Bohne Keimungsalter, Cytokinin-Verarmung und Kinetin/Tween-Applikation auf das Verhältnis auswirken, in dem die Nukleinsäure-Komponenten jeweils einer Ribosomensorte nach elektrophoretischer Auftrennung nachweisbar sind.

Tab. 6: Relationen der größeren/kleineren Komponente der cytoplasmatischen rRNA aufgrund planimetrischer Auswertung der Densitogramme von jeweils 3 bis 4 unterschiedlichen Elektrophorese-Ansätzen; Quotienten "25S"/"18S" der rRNA aus Primärblättern von Keimlingen mit Wurzel (mW) und ohne Wurzel (oW), sowie nach Applikation von Tween (oW-T) und Kinetin/Tween (oW-Kin-T).

Alter (Std.)	mW	oW	oW-T	oW-Kin-T
96	2,10	1,89±0,22		
120	2,00	2,14	1,65±0,19	1,64±0,09
144	2,03	2,09	1,82±0,18	1,90±0,19
168	2,03	2,13	1,58±0,20	1,62±0,13

Sowohl für Primärblätter von Normalkeimlingen als auch für Primärblätter mit verminderter Cytokinin-Versorgung ist der Quotient aus den cytoplasmatischen rRNA-Komponenten - "25S"/"18S" - während des Untersuchungszeitraumes konstant

und hat den Wert 2. Bei wurzellosen Keimlingen, denen Kinetin/Tween- oder ausschließlich Tween-Lösung appliziert worden war, weicht das Verhältnis der cytoplasmatischen rRNA-Komponenten zueinander nach 120 Std. und nach 168 Std. Keimung von der tatsächlichen Verteilung in vivo ab. Da eine geringere Stabilität der "18S"-Komponente einen größeren Quotienten zur Folge hätte, werden die hier ermittelten kleineren Quotienten "25S"/"18S" auf Stabilitätsveränderungen der "25S"-Untereinheit zurückgeführt.
Das Verhältnis "25S"/"18S" wird gegenüber dem entsprechenden Vergleichsansatz (mW bzw. oW-T) weder durch Cytokinin-Verarmung nach Wurzelverlust noch durch Kinetin/Tween-Applikation auf wurzellose Keimlinge verändert. Der kleinere Quotient bei 120 Std. und 168 Std. alten Keimlingen kommt offenbar durch die Behandlung der Primärblätter mit Tween-Lösung zustande.

Für die plastidären Untereinheiten der rRNA sei zusammenfassend angemerkt, daß

1. bei den 4 durchgeführten Versuchsansätzen in Primärblättern 96 Std. alter, wurzelloser Keimlinge die "16S" nur zweimal, bei gleichaltrigen Normalkeimlingen nur dreimal nachgewiesen werden konnte;
2. der Quotient"23S"/"16S" durchschnittlich den Wert 2,5 hat;
3. aufgrund der Streuung der Quotienten nicht entschieden werden kann, ob speziell die Behandlung mit Tween-Lösung das Verhältnis der plastidären Komponenten untereinander verändert.

2. Nukleinsäure-Anteile der cytoplasmatischen und plasidären Ribosomen

Der absolute Gehalt an cytoplasmatischer ("25S" + "18S") und plastidärer ("23S" + "16S") rRNA pro Primärblatt kann aufgrund der hier angewendeten planimetrischen Auswertung

nicht bestimmt werden, da andere Anteile des aufgetragenen Gesamt-Nukleinsäure-Extraktes als die DNA und die ribosomale RNA unberücksichtigt blieben.

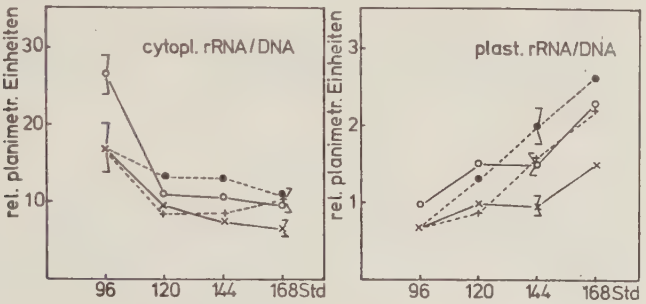

Abb. 12 Gehalt an cytoplasmatischer und plastidärer rRNA, bezogen auf die DNA-Menge (= 1) in Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) und wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (●) oder Tween-Lösung (+). (Planimetrische Auswertung wie bei Abb. 11).

a) Cytoplasmatische rRNA ($rRNA_{cyt}$)

Bei 96 Std. alten vollständigen Keimlingen enthalten die Primärblätter $rRNA_{cyt}$ und DNA im Verhältnis 25:1. In Primärblättern wurzelloser Keimlinge werden dagegen nur etwa 17 Anteile $rRNA_{cyt}$ pro DNA ermittelt (vgl. Abb. 12). Bis 120 Std. nach Keimungsbeginn vermindert sich der Quotient $rRNA_{cyt}$/DNA auf den Wert 10.

Während bei eingeschränkter Cytokinin-Versorgung der relative Gehalt an $rRNA_{cyt}$ pro DNA-Menge auch weiterhin leicht abnimmt, wird in Primärblättern vollständiger bzw. kinetinbehandelter, wurzelloser Keimlinge das Verhältnis $rRNA_{cyt}$/DNA im Laufe der weiteren Entwicklung (bis 168 Std.) annähernd konstant gehalten. Dabei ist der Quotient $rRNA_{cyt}$/DNA für wurzellose Keimlinge, denen Kinetin/Tween appliziert worden war, gegenüber dem Verhältnis von Normalkeimlingen geringfügig erhöht.

Nach 144 Std. Keimung bewirkt bereits Tween-Lösung allein, daß in cytokininverarmten Primärblättern der Gehalt an $rRNA_{cyt}$ pro DNA ansteigt. Der Quotient $rRNA_{cyt}$/DNA, den Primärblätter wurzelloser, 168 Std. alter Keimlinge nach Behandlung mit Tween-Lösung aufweisen, wird auch dann nicht weiter vergrößert, wenn zusammen mit Tween-Lösung Kinetin appliziert worden war.

b) Plastidäre rRNA ($rRNA_{plast}$)

In etwa vergleichbar mit den Befunden für die cytoplasmatischen rRNA-Anteile pro DNA-Gehalt bei 96 Std. alten Primärblättern wirkt sich der Cytokinin-Mangel während der frühen Entwicklung auch auf die plastidären Anteile der rRNA aus. Nach 4 Tagen Keimung enthalten die Primärblätter wurzelloser Keimlinge, bezogen auf ihren DNA-Gehalt, etwa 30 % weniger $rRNA_{plast}$ als bei Normalkeimlingen (Abb. 12). Im Unterschied zur cytoplasmatischen rRNA, deren Mengenverhältnis zur DNA sich nach 120 Std. nur noch unwesentlich verschiebt, nimmt der Gehalt an $rRNA_{plast}$ pro DNA während des gesamten untersuchten Entwicklungszeitraumes zu. Bei vollständigen Keimlingen erhöht sich der Gehalt an $rRNA_{plast}$ relativ zur DNA-Menge insgesamt um den Faktor 2,5. Cytokinin begünstigt diesen Zuwachs unmittelbar, derart, daß die Wirkung der Kinetin/Tween-Applikation in 120 Std. alten Primärblättern die verminderte Cytokinin-Versorgung bei wurzellosen Keimlingen kompensiert hat. Vom 6. Keimungstag an fördert dann Kinetin/Tween mehr als die Wurzel. Gegenüber wurzellosen ist bei vollständigen, 144 Std. alten Keimlingen der Gehalt an $rRNA_{plast}$ pro DNA um 50 % erhöht ($p = 0,05$), nach Kinetin/Tween-Applikation vergleichsweise um 100 %.

Bereits der Einfluß von Tween allein erhöht jedoch bei wurzellosen Keimlingen den auf die DNA-Menge bezogenen Gehalt an $rRNA_{plast}$. Das für Primärblätter 144 Std. alter und 168 Std. alter Normalkeimlinge ermittelte Verhältnis von

plastidärer rRNA und DNA-Menge kann auch bei entsprechend alten cytokininverarmten Primärblättern nachgewiesen werden, wenn wurzellose Keimlinge ausschließlich mit Tween-Lösung behandelt worden waren.

3. Anteil der plastidären rRNA an der Gesamt-rRNA

Im vorangegangenen wurde festgestellt, daß sich während der Primärblattentwicklung die Mengenverhältnisse cytoplasmatischer und plastidärer rRNA gegenüber dem DNA-Gehalt grundsätzlich verschiedenartig ändern und daß Cytokinin den relativen Anteil beider Fraktionen fördert. Zu klären ist, ob der prozentuale Anteil der plastidären rRNA an der Gesamt-rRNA außer vom Entwicklungsalter der Primärblätter auch von der Cytokinin-Versorgung abhängt.

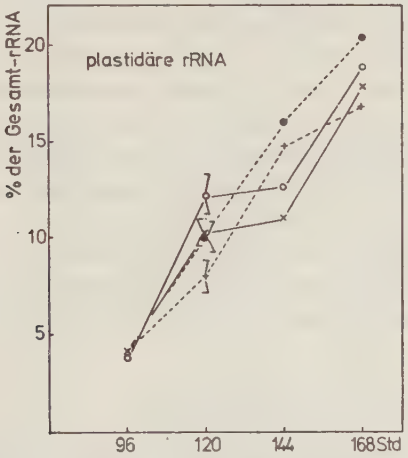

Abb. 13 Prozentualer Anteil plastidärer rRNA an der Gesamt-rRNA von Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (•) bzw. Tween-Lösung (+).
(Planimetrische Auswertung der rRNA-Gipfel, vgl. Abb. 11).

In Primärblättern 96 Std. alter Keimlinge mit und ohne Wurzel sind gleichermaßen 4 % der rRNA den plastidären Ribosomen zuzuordnen. Während der weiteren Entwicklung erhöht sich der prozentuale Anteil an plastidärer rRNA kontinuierlich, so daß nach 168 Std. Keimung zwischen 17 % und 21 % der gesamten ribosomalen RNA als plastidäre rRNA identifiziert werden können.
Vom 4. Keimungstag an ist die Tendenz zu beobachten, daß bei Primärblättern, die von der Wurzel her mit Cytokinin versorgt werden oder denen Kinetin/Tween appliziert worden war, die Anteile plastidärer rRNA gegenüber wurzellosen Keimlingen ohne bzw. mit Tween-Behandlung leicht erhöht sind. Die unterschiedliche Cytokinin-Versorgung wirkt sich aber bis 168 Std. nach Keimungsbeginn nicht wirklich signifikant auf den plastidären Anteil der rRNA aus. Auch aufgrund eines entsprechenden prozentualen Vergleichs der jeweiligen größeren oder kleineren Untereinheit von cytoplasmatischer und plastidärer rRNA gibt es keinen Hinweis dafür, daß Cytokinine den Gehalt der Primärblätter an plastidärer rRNA anders als den der cytoplasmatischen rRNA beeinflussen.
Veränderungen im Zuwachs von plastidärer und cytoplasmatischer rRNA hängen somit gleichermaßen vom Cytokinin-Angebot in den Primärblättern ab, und das Verhältnis von plastidärer rRNA und cytoplasmatischer rRNA wird überwiegend durch das Keimlingsalter vorgegeben.

H. Nukleotidverteilung in der RNA

Bei Algen ist die Basenverteilung in der Gesamt-RNA zur Charakterisierung bestimmter Phasen des Entwicklungszyklus diskutiert worden (LORENZEN u. RUPPEL, 1960; GALLING, 1965). Für die Primärblätter von Phaseolus wird hier untersucht, wie sich die Nukleotidzusammensetzung der Gesamt-RNA während der Entwicklung ändert und wie sich dabei Cytokinin-Verarmung und Kinetin/Tween-Applikation auswirken.
Von der Nukleotidmenge der Gesamt-RNA, die dem Gemisch ver-

schiedenster Fraktionen (sRNA, mRNA, rRNA, Ribonukleotide) entstammt, sind in 168 Std. alten Primärblättern etwa 70 % bis 80 % der rRNA zuzuordnen. Da der Anteil plastidärer rRNA, bezogen auf die gesamte rRNA, während der Entwicklung weitestgehend cytokininunabhängig zunimmt, sollte eine mögliche Veränderung der Nukleotidzusammensetzung der rRNA, die auf Anteilsänderungen der plastidären rRNA beruhen könnte, auch nicht durch das Cytokinin-Angebot beeinflußt werden.
Die Frage ist, ob die Nukleotidverteilung in der Gesamt-RNA - entsprechend der Erwartung für die Basenzusammensetzung der ribosomalen RNA - nur vom Entwicklungsalter der Primärblätter abhängt.

1. Vergleich der Verhältnisse der Purin- und Pyrimidin-Anteile in Gesamt-RNA und rRNA während der Primärblattentwicklung

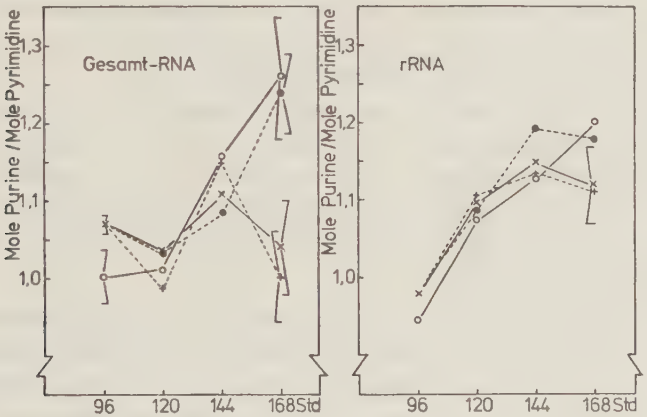

Abb. 14 Vergleich des Mol-Gehaltes an Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden in der Gesamt-RNA und der rRNA von Primärblättern etiolierter Keimlinge mit (o) und ohne Wurzel (x) oder wurzelloser Keimlinge nach Applikation von Kinetin/Tween- (•) bzw. Tween-Lösung (+).

Abgesehen von dem leicht erhöhten Purin-Anteil in der Gesamt-RNA von Primärblättern wurzelloser, 96 Std. alter Keimlinge, der nicht wirklich signifikant vom Purin-Anteil bei gleichaltrigen Normalkeimlingen abweicht, werden Purin- und Pyrimidin-Nukleotide in der Gesamt-RNA zwischen dem 4. und 5. Keimungstag etwa in gleichbleibendem Verhältnis und zu gleichen Teilen nachgewiesen. Bei der Gesamt-RNA von Normalkeimlingen und wurzellosen Keimlingen, denen Kinetin/Tween appliziert worden war, erhöht sich vom 5. Keimungstag an der relative Gehalt an Purin-Basen.
Auch in Primärblättern wurzelloser Keimlinge nimmt der Quotient: Purin-/Pyrimidin-Gehalt zunächst wie bei Normalkeimlingen zu. Vom 6. Keimungstag an wird jedoch in der Gesamt-RNA von cytokininverarmten Primärblättern ein gesteigerter Zuwachs an Pyrimidin-Anteilen beobachtet, so daß Primärblätter von 168 Std. alten wurzellosen Keimlingen wieder dasselbe Purin/Pyrimidin-Verhältnis aufweisen wie nach 120 Std. Keimung. Die Behandlung mit Tween-Lösung beeinflußt bei cytokininverarmten Primärblättern diesen Abfall im Purin/Pyrimidin-Quotienten der Gesamt-RNA nicht.
Der Quotient der Purin-/Pyrimidin-Anteile von Gesamt-RNA aus Primärblättern wurzelloser, 168 Std. alter Keimlinge, denen Kinetin/Tween appliziert worden war, weicht vom entsprechenden Quotienten bei ausschließlich mit Tween-Lösung behandelten wurzellosen, 168 Std. alten Keimlingen signifikant ab ($p = 0{,}02$).

Im Vergleich dazu steigt während der Primärblattentwicklung bei der rRNA das Verhältnis von Purin-/Pyrimidin-Gehalt bereits zwischen 96 Std. und 120 Std. nach Keimungsbeginn an. Der Tendenz nach wirkt sich in Primärblättern von 168 Std. alten Keimlingen eine Cytokinin-Verarmung auch auf das Purin/Pyrimidin-Verhältnis der rRNA aus; im Gegensatz zur Gesamt-RNA sind aber bei der rRNA aus Primärblättern wurzelloser, 168 Std. alter Keimlinge die Quotienten der Purin-/Pyrimidin-Anteile nicht signifikant kleiner als bei der rRNA von Normalkeimlingen oder wurzellosen Keimlingen mit Kinetin/Tween-Applikation.

2. Basenzusammensetzung der RNA in 168 Std. alten Primärblättern

Der Rückgang des relativen Purin-Gehaltes in der Gesamt-RNA aus Primärblättern 168 Std. alter, cytokininverarmter Keimlinge kann nur bedingt auf Veränderungen im Purin/Pyrimidin-Verhältnis der rRNA zurückgeführt werden. Um diesen Befund zu verdeutlichen, werden für Primärblätter 168 Std. alter Keimlinge mit unterschiedlicher Cytokinin-Versorgung die Nukleotidzusammensetzungen von Gesamt-RNA, rRNA und des aus der Differenz errechneten restlichen RNA-Gemisches ("Rest-RNA") verglichen.

Tab. 7: Nukleotidzusammensetzung (in Mol %) der Gesamt-RNA, der ribosomalen RNA und der aus der Differenz dieser beiden Bestimmungen errechneten "Rest-RNA" von Primärblättern 168 Std. alter Keimlinge mit Wurzel (mW), ohne Wurzel (oW) sowie wurzelloser Keimlinge mit Tween-Behandlung (oW-T) oder nach Kinetin/Tween-Applikation (oW-Kin-T).

		Nukleotidverteilung (Mol %) CMP	AMP	GMP	UMP
Gesamt-RNA	mW	24,5	21,3	34,3	19,9
	oW	28,6	19,1	31,9	20,4
	oW-T	26,3	19,8	31,0	22,9
	oW-Kin-T	22,6	21,7	33,8	21,9
rRNA	mW	23,2	22,0	32,5	22,3
	oW	23,7	21,1	31,7	23,5
	oW-T	24,0	20,3	32,1	23,6
	oW-Kin-T	23,2	21,4	32,8	22,6
"Rest-RNA" (errechnet)	mW	28,3	19,3	39,1	13,3
	oW	50,0	9,5	32,4	8,1
	oW-T	31,9	18,9	28,5	20,7
	oW-Kin-T	19,3	23,9	38,0	18,8

Die Nukleotidzusammensetzung der rRNA wird in Primärblättern 168 Std. alter Keimlinge weder durch den Wurzelverlust der Keimlinge noch durch nachfolgende Kinetin/Tween-Applikation

beeinflußt. Merkmale dieser Fraktion sind der hohe Gehalt an Guanin und gleichmäßig niedrigere Anteile der Basen Cytosin, Adenin und Uracil.
Auch die Gesamt-RNA der Primärblätter von Normalkeimlingen und wurzellosen Keimlingen mit Kinetin/Tween-Applikation zeichnet sich durch einen hohen Guanin-Gehalt aus. Bei Cytokinin-Mangel nimmt besonders der relative Gehalt an Cytosin zu, die Adenin- und Guanin-Anteile sind vermindert.

Für die "Rest-RNA", die im Mittel 20 % der Nukleotidmenge der Gesamt-RNA enthält, errechnet sich bei 168 Std. alten Normalkeimlingen ein hoher Gehalt an Cytosin und Guanin. Der Anteil des Cytosin wird im Cytokinin-Mangel auffallend vergrößert, der relative Gehalt an Adenin und Uracil nimmt stark, der von Guanin nur geringfügig ab. Bei wurzellosen Keimlingen, denen Kinetin/Tween appliziert worden war, wird für die errechnete "Rest-RNA" eine Basenzusammensetzung ermittelt, die der Verteilung in der rRNA ähnelt; der Gehalt der "Rest-RNA" an Adenin und Uracil entspricht dabei in etwa den Werten bei Normalkeimlingen.
In der "Rest-RNA" von cytokininverarmten Primärblättern, die mit Tween-Lösung (ohne Kinetin) behandelt worden waren, wird bereits der für die "Rest-RNA" von Normalkeimlingen typische Gehalt an Cytosin und Adenin errechnet; gleichzeitig sind aber die Guanin-Anteile vermindert und die Uracil-Anteile erhöht.

Auf das Verhältnis der Purin-/Pyrimidin-Anteile (Pur/Pyr) in der errechneten "Rest-RNA" wirken sich das Cytokinin der Wurzel und das applizierte Kinetin vergleichbar aus. Für Normalkeimlinge (Quotient Pur/Pyr: 1,41) und wurzellose Keimlinge mit Kinetin/Tween-Applikation (Quotient Pur/Pyr: 1,62) sind die Purin-Anteile gegenüber wurzellosen Keimlingen ohne Tween-Behandlung (Quotient Pur/Pyr: 0,72) und mit Tween-Behandlung (Quotient Pur/Pyr: 0,90) erhöht.

IV. DISKUSSION

Die Nettoproduktion an Proteinen und Nukleinsäuren in den Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge wird durch Cytokinine beeinflußt. Aus Tab. 8 ist ersichtlich, daß verschiedene Enzyme und Nukleinsäure-Fraktionen unterschiedlich deutlich auf Veränderungen in der Cytokinin-Versorgung reagieren. Im folgenden wird vergleichend diskutiert, wie sich Änderungen des Cytokinin-Angebotes auf die Aktivitäten dieser Enzyme und auf die Nukleinsäure-Zusammensetzung auswirken und welche Hinweise sich daraus für die Wirkungsweise von Cytokininen ergeben.

Tab. 8: Auswirkungen eines unterschiedlichen Cytokinin-Angebotes auf verschiedene Enzymaktivitäten sowie auf den Protein- und Nukleinsäure-Gehalt in Primärblättern 168 Std. alter, etiolierter Bohnenkeimlinge. Die Werte der Tabelle geben jeweils die prozentuale Veränderung aufgrund der im Zähler genannten gegenüber der im Nenner bezeichneten Keimlingsbehandlung = 100 % an.
Keimlinge mit (mW) und ohne Wurzel (oW) sowie wurzellose Keimlinge, denen nach 100 Std. Keimung (= 50 Std. nach Wurzelverlust) Kinetin/Tween-Lösung (oW-Kin-T) oder nur Tween-Lösung (oW-T) appliziert worden war.
DNA-Bestimmungen nach Hydrolyse der RNA mit NaOH (DNA_1) und aus Eluaten der MAK-Chromatographie (DNA_2).

	Enzymaktivitäten bzw. Protein- und Nukleinsäure-Gehalt (%-Angaben)			
	oW/ mW	oW-Kin-T/ oW	oW-Kin-T/ oW-T	oW-T/ oW
Protein	- 44	+ 131	+ 98	+ 17
ShikSDH	- 26	+ 88	+ 105	- 8
G6PDH	+ 12	+ 32	+ 160	- 49
6PGSDH	+ 2	+ 42	+ 104	- 30
RuDPCO	- 62	+ 271	+ 76	+ 111
TPNabh. GAPDH	- 58	+ 100	+ 44	+ 43
Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt	- 28	+ 114	+ 139	- 10
rRNA	- 34	+ 130	+ 158	- 10
sRNA	- 38	+ 146	+ 186	- 14
DNA_1	- 17	+ 90	+ 180	- 35
DNA_2	- 18	+ 74	+ 109	- 16

Während Cytokinin-Mangel bei etiolierten Roggenkeimlingen (deBOER, 1972) bereits drei Tage nach Wurzelverlust die allgemeine Syntheseleistung (lösl. Protein) der Primärblätter einschränkt und gleichzeitig auch die Aktivitätszunahme des Zwischenfermentes (G6PDH) vermindert, wirkt sich bei etiolierten Bohnenkeimlingen die Cytokinin-Verarmung erst vier Tage nach Wurzelverlust auf den Protein-Gehalt der Primärblätter aus und beeinflußt hier die Aktivitäten von Enzymen des oxydativen Pentosephosphat-Zyklus (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-Gluconsäure-Dehydrogenase) auch während weiterer 24 Std. Dunkelkeimung nicht (PAUL, 1970).
Die Aktivitäten der Shikimisäure-Dehydrogenase (ShikSDH) in Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge verhalten sich - den Befunden an Roggensprossen (FEIERABEND, 1970) vergleichbar - gegenüber Änderungen der Cytokinin-Versorgung ähnlich wie die allgemeine Syntheseleistung (lösl. Protein) der Primärblätter.

Spezifisch sind dagegen die Aktivitäten von Enzymen des reduktiven Pentosephosphat-Zyklus durch Veränderungen im Cytokinin-Angebot betroffen. So vermindert sich in cytokininverarmten Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge der Aktivitätsanstieg der Carboxydismutase (RuDPCO) und der Triosephosphat-Dehydrogenase (TPNabh. GAPDH) im Laufe der untersuchten Entwicklung unverhältnismäßig mehr als die Zunahme des Protein-Gehaltes. Nach Applikation einer Lösung von 10^{-4} g/ml Kinetin mit Tween auf Primärblätter wurzelloser Bohnenkeimlinge, bei denen die Bildung der Plastidenenzyme bereits eingesetzt hat (vgl. dazu FEIERABEND, 1969; Befunde an Roggen), nehmen bei gleichzeitig erhöhter Syntheseleistung der Primärblätter vorrangig die Aktivitäten von Enzymen des Calvin-Zyklus zu. Die Aktivitäten der Carboxydismutase steigen dabei um den Faktor 2,7 an, demgegenüber der Protein-Gehalt (lösl. Protein/Primärblatt) nur um den Faktor 1,3. Anders als bei Sprossen

(FEIERABEND, 1969) und Primärblättern (deBOER, 1972) etiolierter Roggenkeimlinge reicht bei etiolierten Bohnenkeimlingen die nach Wurzelverlust eingeschränkte Cytokinin-Versorgung offenbar bis zum 5. Keimungstag (120 Std.) aus, um die Synthese von Enzymen des Calvin-Zyklus zunächst normal ablaufen zu lassen.
Der Vergleich von Auswirkungen der Cytokinin-Verarmung nach Wurzelverlust und der Kinetin/Tween-Applikation auf wurzellose Keimlinge bei Primärblättern etiolierter Roggen- und Bohnenkeimlinge (sh. FEIERABEND, 1972: Tab. 1 und Tab. 8 hier) zeigt, daß sich wie bei den hier verglichenen Keimlingen entsprechende Änderungen des Cytokinin-Angebotes verschieden deutlich manifestieren können, daß jedoch die grundsätzliche Abstufung des Cytokinin-Bedarfs für die Proteinsynthese und für den Aktivitätsanstieg bei Enzymen des oxydativen und reduktiven Pentosephosphat-Zyklus erhalten bleibt. Unterschiede im Hormonhaushalt, die u. a. dafür verantwortlich sein könnten, daß die Vorbereitung des Photosyntheseapparates im Dunkeln bei Roggenkeimlingen weiter fortschreitet als bei Bohnen- oder Erbsenkeimlingen (vgl. SMILLIE u. SCOTT, 1969), erklären möglicherweise auch das unterschiedliche Ausmaß, in dem sich eine Änderung des Cytokinin-Angebotes auswirkt.

Im Gegensatz zu den Befunden an Roggen (deBOER, 1972) fördert in cytokininverarmten Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge bereits die Kontrollbehandlung mit einer 0,01%igen Lösung des als Netzmittel verwendeten Tween20 allein - formal wie (mit) Cytokinin - selektiv die Bildung von Enzymen des Calvin-Zyklus. Im Vergleich dazu berichten DUDA u. CHERRY (1971) von Auswascheffekten bei Zuckerrüben, die der Wirkung von Wuchsstoffbehandlungen (Auxin, Gibberellin) auf das Wurzelchromatin ähneln. Tween20 beeinflußt bei wurzellosen Bohnenkeimlingen jedoch nicht die Cytokinine den Gehalt der Primärblätter an löslichem Protein. Die Trennbarkeit von cytokinin-stimulierter Erhöhung des Protein-Gehaltes/

Primärblatt und selektiver Aktivitätszunahme/Primärblatt bei Enzymen des Calvin-Zyklus macht deutlich, daß Cytokinine bei Bohnenkeimlingen den Mechanismus der Aktivitätserhöhung bei Enzymen des reduktiven Pentosephosphat-Zyklus auf andere Weise als das Ausmaß der allgemeinen Syntheseleistung (lösl. Protein) der Primärblätter kontrollieren.

Änderungen des Cytokinin-Angebotes beeinflussen den Nukleinsäure-Gehalt von Primärblättern 168 Std. alter, etiolierter Bohnenkeimlinge in vergleichbarem Ausmaß wie den Protein-Gehalt (Tab. 8). Cytokinin-Mangel vermindert in Primärblättern wurzelloser Keimlinge die Nukleinsäure-Produktion (nach 120 Std.) jedoch frühzeitiger als die Zunahme des Protein-Gehaltes (nach 144 Std.); exogenes Cytokinin (Kinetin) fördert bei wurzellosen Bohnenkeimlingen die Zunahme des Nukleinsäure-Gehaltes der Primärblätter unmittelbar.

Nukleinsäure- und Proteinsynthese sind Ausdruck des Wachstums. Wachstumsänderungen in diesem Sinne können bei Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge auf einer durch Cytokinine kontrollierten Größenzunahme und/oder Teilungsaktivität der Zellen beruhen.
Wachstum, das auf Zellzuwachs der Primärblätter beruht, setzt eine entsprechende DNA-Synthese voraus. Der DNA-Gehalt der Primärblätter etiolierter Bohnenkeimlinge wird durch das Cytokinin-Angebot beeinflußt. DNA-Gehalt und Zellzahl der Primärblätter müssen dabei nicht zwangsläufig korrelieren. Beispielsweise fördert Cytokinin-Mangel bei älteren Kulturen (nach 6 Tagen) von Sojabohnengewebe die DNA-Synthese (^{3}H-Thymidineinbau) gegenüber Kulturen mit Kinetin im Medium; Cytokinin-Mangel induziert hier jedoch durch Einschränkung der Teilungsaktivität der Gewebe Polyploidie (FOSKET u. SHORT, 1973). Die Bildung polyploider Zellen in cytokininverarmten Primärblättern ist demnach nicht auszuschließen.
Der DNA-Gehalt von Primärblättern wurzelloser Bohnenkeim-

linge, der zunächst (nach 96 Std.) sogar gegenüber dem bei Normalkeimlingen leicht erhöht ist, wird während des untersuchten Entwicklungszeitraumes nur schwach und nicht signifikant von der Cytokinin-Verarmung betroffen. Dem Cytokinin der Keimlingswurzel analog fördert Kinetin, wenn es wie in den vorliegenden Untersuchungen zusammen mit Tween20 appliziert wurde, bei wurzellosen Bohnenkeimlingen den DNA-Gehalt der Primärblätter entsprechend weniger als den Protein-Gehalt. Die ungleich stärkeren Veränderungen im Protein-Gehalt/Primärblatt können daher nicht ausschließlich die Folge einer durch Cytokinine limitierten Genom-Replikation sein. Gegen eine primäre Auswirkung des Cytokinin-Angebotes auf den DNA-Gehalt der Primärblätter etiolierter Bohnenkeimlinge spricht auch, daß bereits zu Beginn der untersuchten Entwicklung der prozentuale DNA-Anteil am Gesamt-Nukleinsäure-Gehalt der Primärblätter bei wurzellosen gegenüber Normalkeimlingen erhöht ist, obwohl bis 120 Std. nach Keimungsbeginn Cytokinin-Mangel ganz sicher nicht den DNA-Gehalt der Primärblätter einschränkt. Einen nur mittelbar durch Cytokinine kontrollierten Mechanismus der DNA-Replikation postulieren u. a. SIMARD (1971) und JOUANNEAU et al (1973) für Tabakgewebekulturen.

Deutlicher als auf den DNA-Gehalt der Primärblätter wirken sich bei etiolierten Bohnenkeimlingen Änderungen des Cytokinin-Angebotes auf den Gehalt der Primärblätter an ribosomaler RNA aus. Bei 168 Std. alten, wurzellosen Bohnenkeimlingen sind gleichermaßen rRNA- und Protein-Gehalt der Primärblätter gegenüber Normalkeimlingen vermindert und nach Kinetin/Tween-Applikation erhöht. Cytokinine stimulieren auch in anderen Fällen sowohl die rRNA- als auch die Proteinsynthese (SKOOG u. ARMSTRONG, 1970).
Gegen die Interpretation, daß die Menge des löslichen Proteins/Primärblatt bei etiolierten Bohnenkeimlingen aufgrund eines durch Cytokinine kontrollierten rRNA-Gehaltes der Primärblätter begrenzt wird, sprechen folgende Befunde:

1. Zwischenzeitlich (nach 120 Std. und 144 Std. Dunkel-

keimung) korrelieren bei Keimlingen mit und ohne Wurzel die Änderungen des Protein- und rRNA-Gehaltes nicht.

2. Bei 168 Std. alten Bohnenkeimlingen fördert Kinetin (sh. Tab. 8, "oW-Kin-T/oW-T") die Nettosynthese der ribosomalen RNA mehr als die des löslichen Proteins.

Da der Gehalt der Primärblätter an sRNA (1. RNA-Fraktion bei der MAK-Chromatographie) während der untersuchten Entwicklungsdauer unabhängig vom Cytokinin-Angebot weniger als der rRNA-Gehalt der Primärblätter zunimmt, ist offenbar auch das rRNA/sRNA-Verhältnis (bei 96 Std.: 5:1; bei 168 Std.: 8:1) nicht verantwortlich für die eingeschränkte Syntheseleistung (lösl. Protein) der Primärblätter bei wurzellosen Bohnenkeimlingen. Auch bei Chlorella besteht während des Entwicklungszyklus kein direkter Zusammenhang zwischen Änderungen des rRNA/sRNA-Gehaltes und der Höhe der Protein-Produktion der Zellen (ENÖCKL, 1968); und bei Suspensionskulturen von Tabakgewebe reagiert die sRNA-Synthese weniger empfindlich und erst vier Tage später als die rRNA-Synthese auf hohe Kinetin-Konzentrationen ($2{,}5 \times 10^{-5}$ M; NUDEL u. BAMBERGER, 1971).

Ein Vergleich des rRNA- und DNA-Gehaltes in Primärblättern mit unterschiedlicher Cytokinin-Versorgung (vgl. Tab. 5) macht deutlich, daß bei Cytokinin-Versorgung durch die Wurzel und nach Kinetin/Tween-Applikation das rRNA/DNA-Verhältnis gegenüber cytokininverarmten Primärblättern erhöht ist. Wenn Zellvergrößerung mit einem zunehmenden Ribosomen-Gehalt pro Genom verbunden ist, dann beruht bei den hier untersuchten Bohnenkeimlingen ein durch Cytokinine gefördertes Wachstum der Primärblätter auch auf einer Größenzunahme der Zellen. Nach HUMPHRIES u. WHEELER (1960) wirkt sich Kinetin auf das Wachstum von Primärblättern sechs Tage alter, etiolierter Bohnenkeimlinge ausschließlich aufgrund einer Größenzunahme der Zellen aus. Ein erhöhtes rRNA/DNA-Verhält-

nis der Primärblätter charakterisiert jedoch nicht in spezifischer Weise nur Cytokinin-Aktionen. So berichten SKOOG, 1954 (IAA bei Tabakgewebe) und KEY et al, 1966 (2,4D an Sojabohnen-Keimlingen) von einer durch Auxine begünstigten Erhöhung des rRNA/DNA-Verhältnisses. Bei den hier untersuchten Bohnenkeimlingen wird zudem bei cytokininverarmten Primärblättern das rRNA/DNA-Verhältnis bereits durch Behandlung mit Tween-Lösung (Netzmittellösung ohne Kinetin) erhöht. Im Unterschied zu der Wirkung von Cytokininen verändert der Tween-Einfluß jedoch nicht den Protein- und rRNA-Gehalt der Primärblätter wurzelloser Bohnenkeimlinge. Das veränderte rRNA/DNA-Verhältnis beruht hier auch nicht wie bei der Cytokinin-Wirkung darauf, daß der rRNA-Gehalt stärker als der DNA-Gehalt zunimmt, sondern auf einem frühzeitigen Stagnieren der DNA-Zunahme (nach 144 Std.).
Den formal ähnlichen Effekten der oben verglichenen Cytokinine, Auxine und der Tween-Lösung auf das rRNA/DNA-Verhältnis sind nicht durchweg auch einander entsprechende Befunde im Bereich der Proteinsynthese zuzuordnen. Cytokinin wie auch der Einfluß von Tween20 fördert bei Bohnenkeimlingen selektiv die Aktivitäten von Enzymen des Calvin-Zyklus. Die Behandlung mit Tween-Lösung erhöht jedoch nicht wie Cytokinine auch den Protein-Gehalt der Primärblätter wurzelloser Bohnenkeimlinge. 2,4D erhöht bei Sojabohnen-Keimlingen (KEY et al, 1966) ähnlich wie die Cytokinine bei Bohnenkeimlingen den rRNA-Gehalt mehr als den Protein-Gehalt. 2,4D vermindert aber in Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge selektiv die Aktivitäten von Enzymen des reduktiven gegenüber denen des oxydativen Pentosephosphat-Zyklus (PAUL, 1970).
Der Einfluß der Cytokinine der Keimlingswurzel auf den Gehalt der Primärblätter an löslichem Protein oder auf das rRNA/DNA-Verhältnis kann demnach bei etiolierten Bohnenkeimlingen nicht primär die Ursache für die Regulation der Aktivitäten photosynthetischer und nichtphotosynthetischer Enzyme sein.

Parallel zum Anstieg der spezifischen Aktivitäten (Enzymaktivitäten/lösl. Protein) von Enzymen des reduktiven Pentosephosphat-Zyklus nimmt in Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge der plastidäre Anteil an der Gesamt-ribosomalen-RNA zu (von 4 % bei 96 Std. auf 20 % bei 168 Std.). Bei Gersteblättern, in denen wie bei Bohnenkeimlingen die Plastiden-rRNA während der Dunkelkeimung gegenüber der cytoplasmatischen rRNA stärker ansteigt, geht der Bildung des Fraktion-I-Proteins (Carboxydismutase) eine Erhöhung der plastidären rRNA voraus (SMITH, 1970). Bei Sproßspitzen von Pisum bleibt der relative Anteil der plastidären rRNA während der Dunkelkeimung auf einem unverändert niedrigen Niveau, wird aber nach Aktivierung des Phytochrom-Systems auf vergleichbare Werte wie bei Bohnenkeimlingen gefördert (SCOTT et al, 1971). Gleich hohe Aktivitäten wie nach Aktivierung des Phytochrom-Systems erreichen die Enzyme des Calvin-Zyklus bei Roggenkeimlingen auch nach Erhöhung des Cytokinin-Angebotes (Applikation einer Lösung von 10^{-4} g/ml Kinetin mit Tween) bei Dunkelkeimlingen (FEIERABEND, 1969). Die Erwartung, daß in Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge der Anteil plastidärer rRNA an der Gesamt-rRNA durch Cytokinin-Verarmung oder nach Kinetin/Tween-Applikation in entsprechender Weise wie die Aktivitäten von Enzymen des Calvin-Zyklus betroffen sein könnte, bestätigt sich nicht. Cytokinin-Mangel, auf den der verminderte Gesamt-rRNA-Gehalt der Primärblätter bei wurzellosen, etiolierten Bohnenkeimlingen zurückzuführen ist, wirkt sich unspezifisch sowohl auf die Menge an plastidärer wie cytoplasmatischer rRNA aus. Im Gegensatz zu den Befunden von SCOTT et al (1971) an Pisum wird bei Mais (HAREL u. BOGORAD, 1973) auch nach Aktivierung des Phytochrom-Systems das Verhältnis der Synthese plastidärer und cytoplasmatischer rRNA nicht beeinflußt und ähnelt darin dem Verhalten bei Bohnenkeimlingen mit unterschiedlicher Cytokinin-Versorgung. Im Vergleich dazu beeinflußt auch Kinetin im Medium bei Dunkelkulturen von Tabakgewebe weder das Verhältnis Plastidenzahl/Zellgröße noch das

Verhältnis Plastidenzahl/Zellzahl (BOASSON et al, 1972).

Von der bei HEMLEBEN-VIELHABEN (1966) angegebenen Nukleotidzusammensetzung der Gesamt-rRNA aus Epikotylen und Primärblättern von Phaseolus multiflorus (Dunkelkeimung bei 25°C) unterscheidet sich die Basenverteilung in der Gesamt-rRNA aus Primärblättern von Phaseolus vulgaris (vorliegende Untersuchung) durch einen geringeren Adenin-Gehalt. Änderungen des Cytokinin-Angebotes (Wurzelverlust bzw. Kinetin/Tween-Applikation) wirken sich auf die Basenverteilung in der Gesamt-rRNA aus Primärblättern von Phaseolus vulgaris nicht aus.

Der Befund, daß die Zusammensetzung der ribosomalen RNA (Verhältnis plast. rRNA/cytopl. rRNA; Nukleotidzusammensetzung) durch Änderungen des Cytokinin-Angebotes (oder durch Tween-Einfluß) nicht beeinflußt wird, schließt nicht aus, daß Cytokinine bereits in jungen Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge eine Rolle für die Stabilität des Protein-rRNA-Komplexes der Ribosomen spielen (vgl. SRIVASTAVA u. ARGLEBE, 1968; an Gersteblättern). Trotz genereller Abhängigkeit der rRNA-Synthese vom Cytokinin-Angebot wäre das übereinstimmende Mengenverhältnis von plastidärer rRNA/cytoplasmatischer rRNA in den Primärblättern von Bohnenkeimlingen auch denkbar als Folge einer gegenüber der cytoplasmatischen rRNA höheren Stabilität der plastidären rRNA in vivo (vgl. dazu TREHARNE et al, 1970). Da ausschließlich Vorstufen der rRNA für die Ribosomenbildung verwendet werden, könnte - im Zusammenhang mit einer Ribosomen-stabilisierenden Funktion von Cytokininen - ein geringerer "turn-over" der plastidären rRNA (TREWAVAS, 1970; bei Lemna) die Ursache sein für den besonderen Cytokinin-Bedarf der Proteinsynthesen im Plastiden (z. B. der größeren Untereinheit des Proteins der Carboxydismutase).

Unklar bleibt, aufgrund welcher Zusammenhänge die Behandlung mit Tween-Lösung - formal wie der Einfluß der Keimlingswurzel - bei cytokininverarmten Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge spezifisch die Aktivitäten von Enzymen des

Calvin-Zyklus erhöht, obwohl Tween-Lösung bei abgeschnittenen grünen Tabakblättern und Bohnenprimärblättern nicht wie Cytokinine die Seneszenz verzögert, sondern eher beschleunigt (eigene Voruntersuchungen mit Tween-Lösung, 6-Benzylaminopurin und Kinetin).

Cytokinin-Verarmung nach Wurzelverlust und die Behandlung wurzelloser, etiolierter Bohnenkeimlinge mit Tween-Lösung haben Einfluß auf die Nukleotidzusammensetzung der nichtribosomalen RNA. Die Nukleotidzusammensetzung dieser "Rest-RNA" wurde als Differenz des Mol-Gehaltes von Gesamt-RNA und ribosomaler RNA errechnet.
Der "Rest-RNA" sind durchschnittlich 20 % der Nukleotidmenge zuzuordnen, die für die Gesamt-RNA gemessen werden. Bezogen auf den Mol-Gehalt an Einzelnukleotiden in der jeweils entsprechenden Gesamt-RNA weist die "Rest-RNA" aus Primärblättern wurzelloser Keimlinge im Vergleich zur "Rest-RNA" aus Primärblättern von Normalkeimlingen nur den halben Gehalt an Adenin und Uracil auf. Durch Applikation von Kinetin/Tween-Lösung, aber bereits auch durch Behandlung wurzelloser Keimlinge mit Tween-Lösung allein, lassen sich die Einschränkungen im Gehalt der Basen Adenin und Uracil beheben.
Im Zusammenhang mit Befunden, nach denen Poly(A)- und Oligo(U)-Strukturen auch bei höheren Pflanzen Bestandteile funktionsfähiger mRNA bzw. deren Vorstufen sind (WEINBERG, 1973), wäre zu erwägen, ob die Veränderungen im Adenin- und Uracil-Gehalt der "Rest-RNA" nicht möglicherweise auch auf Veränderungen an der mRNA beruhen. Hinweise dafür, daß Cytokinine eine Rolle auf dem Niveau der Transkription spielen könnten, geben u. a. die Befunde bei ROYCHOUDHURY et al (1965), FELLENBERG (1969), CHALY u. SETTERFIELD (1972).

Nach den vorliegenden Ergebnissen an etiolierten Bohnenkeimlingen kann nicht ausgeschlossen werden, daß Kinetin-Applikationen auf cytokininverarmte Primärblätter erst

in Verbindung mit dem Netzmittel Tween20 die Auswirkungen der Verarmung nach Wurzelverlust vollständig beheben. Kinetin-Applikationen ohne Tween oder im Vergleich zu Tween20 mit anderen Netzmitteln sollten klären, ob bei etiolierten Bohnenkeimlingen die Tween-Wirkung an irgendeiner Stelle des Wirkungsmechanismus von natürlichen Cytokininen angreift oder aber auf ganz andere Weise zustande kommt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Höhe des Protein- und Nukleinsäure-Gehaltes der Primärblätter hängt während der Entwicklung etiolierter Bohnenkeimlinge von der Cytokinin-Versorgung ab.

Die bei wurzellosen Keimlingen eingeschränkte Cytokinin-Versorgung vermindert die Aktivitäten von Enzymen des Calvin-Zyklus frühzeitiger (120 Std.) und deutlich mehr als die Nettoproduktion der Primärblätter an löslichem Protein (144 Std.); die Aktivitäten von Enzymen des oxydativen Pentosephosphat-Zyklus werden dagegen bis 168 Std. nach Keimungsbeginn nicht beeinflußt. Gegenüber Änderungen im Cytokinin-Angebot verhalten sich die Aktivitäten der Shikimisäure-Dehydrogenase ähnlich wie der Protein-Gehalt der Primärblätter.

10^{-4} g/ml Kinetin, in wässriger Lösung zusammen mit dem Netzmittel Tween20 (0,01 %) appliziert, behebt bei wurzellosen Keimlingen den Cytokinin-Mangel. Tween-Lösung allein hat keinen Einfluß auf den Protein-Gehalt und die Aktivitäten der Shikimisäure-Dehydrogenase in cytokininverarmten Primärblättern, erhöht jedoch gegenüber wurzellosen, nicht mit Tween-Lösung behandelten Keimlingen die Aktivitäten von Plastidenenzymen und vermindert die Aktivitäten von Enzymen des oxydativen Pentosephosphat-Zyklus.

Der DNA-Gehalt cytokininverarmter Primärblätter wird gegenüber dem bei Normalkeimlingen nicht signifikant vermindert. Kinetin/Tween-Applikation bei wurzellosen Keimlingen erhöht den DNA-Gehalt der Primärblätter dagegen deutlich. Bei Behandlung 100 Std. alter, cytokininverarmter Keimlinge mit Tween-Lösung allein stagniert die Zunahme im DNA-Gehalt der Primärblätter gegenüber unbehandelten, wurzellosen Keimlingen ab 144 Std. Dunkelkeimung.

Stärker als auf den DNA-Gehalt wirken sich Änderungen im Cytokinin-Angebot auf den rRNA-Gehalt der Primärblätter aus. Cytokinin-Mangel vermindert den rRNA-Gehalt der Primärblätter ab 120 Std. nach Keimungsbeginn; exogenes Cytokinin (Kinetin/

Tween-Applikation) fördert bei wurzellosen Keimlingen die Zunahme des rRNA-Gehaltes der Primärblätter unmittelbar und stärker als das Cytokinin der Wurzel. Tween-Lösung allein hat keinen Einfluß auf den rRNA-Gehalt cytokininverarmter Primärblätter.
Das Mengenverhältnis rRNA/sRNA nimmt zwischen 96 Std. und 168 Std. Dunkelkeimung von 5:1 auf 8:1 zu und hängt nicht vom Cytokinin-Angebot ab.
Ein erhöhtes Cytokinin-Angebot vergrößert dagegen den Quotienten rRNA/DNA. Desgleichen erhöht ist das rRNA/DNA-Verhältnis bei wurzellosen Keimlingen nach Applikation von Tween-Lösung; diese Erhöhung ist - anders als bei vollständigen Keimlingen oder nach Kinetin/Tween-Applikation - nicht die Folge eines erhöhten rRNA-Gehaltes in den Primärblättern sondern die Folge der frühzeitig stagnierenden DNA-Synthese.
Der Anteil plastidärer rRNA an der Gesamt-rRNA erhöht sich zwischen 96 Std. und 168 Std. Dunkelkeimung von 4 % auf 20 %.
Der Gehalt an plastidärer und cytoplasmatischer rRNA wird durch Änderungen des Cytokinin-Angebotes gleichermaßen betroffen; das Verhältnis der plastidären und cytoplasmatischen rRNA-Komponenten zueinander hängt nicht vom Cytokinin-Angebot ab und wird auch durch den Einfluß von Tween20 nicht verändert.
Änderungen der Cytokinin-Versorgung oder die Applikation von Tween-Lösung bleiben ohne Einfluß auf die Nukleotidzusammensetzung der rRNA.
Einschränkungen im Cytokinin-Angebot beeinflussen dagegen die Basenzusammensetzung der "Rest-RNA", die aus der Differenz der Nukleotidmengen von Gesamt-RNA und rRNA errechnet wurde. Die in der "Rest-RNA" cytokininverarmter Primärblätter verminderten Mol-Anteile der Basen Adenin und Uracil werden durch Kinetin/Tween-Applikation, aber bereits auch durch den Einfluß von Tween-Lösung (ohne Kinetin) wieder auf die Werte von Normalkeimlingen erhöht.

Die Auswirkungen eines unterschiedlichen Cytokinin-Angebotes sowie mögliche Wirkungsweisen der Cytokinine werden diskutiert.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß Kinetin bei Primärblättern etiolierter Bohnenkeimlinge erst in Verbindung mit dem Netzmittel Tween20 die Wirkung (von Cytokininen) der Wurzel voll ersetzt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

AUDUS, L.J., 1972: Plant growth substances, Vol. I: Chemistry and Physiology, Seite 332. - N. Polunin(ed.), London: Leonard Hill

BERGER, Ch. und FEIERABEND, J., 1967: Plastidenentwicklung und Bildung von Photosynthese-Enzymen in etiolierten Roggenkeimlingen. - Physiol. Vég. 5 (2), 109 - 122

BEYERSMANN, D., 1971: Nukleinsäuren. - Weinheim: Verlag-Chemie

BOASSON, R., BONNER, J.J. und LAETSCH, W.M., 1972: Induction and regulation of chloroplast replication in mature tobacco leaf tisue. - Plant Physiol. 49, 97 - 101

BOER, J. de, 1972: Vergleich des Einflusses von Cytokinin auf die Enzymaktivitäten der Microbodies und anderer Zellkompartimente in den Sproßorganen von Roggenkeimlingen. - Diplomarbeit Göttingen

BURKARD, G., VAULTIER, J.P. und WELL, J.H., 1972: Differences in the level of plastid-spezific tRNS's in chloroplasts and etioplasts of Phaseolus vulgaris. - Phytochemistry 11 (4), 1351 - 1353

CHALY, N. und SETTERFIELD, D., 1972: Cytokinins and nuclear RNA levels in onion root tips. - Planta (Berl.) 108, 363 - 368

DUDA, C.T. und CHERRY, J.H., 1971: Chromatin- and nuclei-directed ribonucleic acid synthesis in Sugar Beet root. - Plant Physiol. 47, 262 - 268

ENÖCKL, F., 1968: Änderung des tRNS- und rRNS-Gehaltes von Chlorella pyrenoidosa während der Entwicklung. - Z. Pflanzenphysiol. 58, 240 - 247

ERBEN, K., 1967: Zur quantitativen Erfassung der Proteinsynthese-Kapazität in zellfreien Fraktionen von Chlorella. - Z. Pflanzenphysiol. 57, 329 ff.

FEIERABEND, J., 1965: Differenzierungsmuster und Regulationsvorgänge im Enzymsystem von Roggenkeimlingen. - Dissertation Göttingen

FEIERABEND, J., 1969: Der Einfluß von Cytokininen auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen. - Planta (Berl.) 84, 11 - 29

FEIERABEND, J., 1970: Characterization of cytokinin action on enzyme formation during the development of the photosynthetic apparatus in rye seedlings. - Planta (Berl.) 94, 1 - 15

FEIERABEND, J., 1970: Proteinsynthese und Enzymbildung in Keimlingen bei niedrigen Wachstumstemperaturen und ihre Beziehung zum Cytokininhaushalt. - Z. Pflanzenphysiol. 62, 70 -82

FEIERABEND, J., 1972: Regulation der Entwicklung von Zellorganellen bei höheren Pflanzen. - Ber. Dtsch. Bot. Ges. 85, 601 - 613

FELLENBERG, G., 1969: Der Einfluß von Gibberellinsäuren und Kinetin auf die Auxin-induzierte Wurzelneubildung und auf das Nucleoproteid von Erbsenepikotylen. - Z. Pflanzenphysiol. 60, 457 - 466

FOSKET, D.E. und SHORT, K.C., 1973: The role of cytokinin in the regulation of growth, DNA synthesis and cell proliferation in cultured soybeam tissues (Glycine max. var. Biloxi). - Physiol. Plant 28, 14 - 23

GALLING, G., 1965: Über Ribonucleinsäure in Chlorella: 1. Die Basenzusammensetzung der RNS synchroner Chlorellen unter verschiedenen Ernährungsbedingungen. - Flora 155, 596 - 606

HAREL, E. und BOGORAD, L., 1973: Effect of light on ribonucleic acid metabolism in greening maize leaves. - Plant Physiol. 51, 10 - 16

HEMLEBEN-VIELHABEN, V., 1966: Characterization of rapidley labelled nucleic acids in tissues of plant seedlings. - Z. Naturforschung 21b, 983 - 992

HUMPHRIES, E.C. und WHEELER, A.K., 1960: The effects of kinetin, gibberellic acid and light on expansion and cell division in leaf discs of dwarf bean (Phaseolus vulg.). - J. Exp. Bot. 11, 81 - 85

INGLE, J., 1968: Synthesis and stability of chloroplast ribosomal RNAs. - Plant Physiol. 43, 1448 - 1454

JOUANNEAU, J.P., TANDEAU, D.E. und MARSAC, N., 1973: Stepvise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially sychronised tobacco cells. - Expl. Cell Res. 77, 167 - 174

KERSTEN, W., 1973: Der Einfluß von Licht und Acetat auf Dehydrogenasen und ihre Isoenzyme in Chlorogonium elongatum D. - Dissertation Göttingen

KEY, J.L., LIN, C.Y., GIFFORD, E.M. und DENGLER, R., 1966: Relation of 2,4D induced growth aberrations to changes in nucleic acid metabolism in soybean seedlings. - Botan. Gaz. 127, 87 - 94

KEY, J.L., 1969: Hormones and nucleic acid metabolism. - Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 449 - 474

KIRK, I.T.O., 1970: Biochemical aspects of chloroplast development. - Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 11 - 42

KULAEVA, O.N. und ROMANKO, E.G., 1967: Die Wirkung von 6-Benzylaminopurin auf isolierte Chloroplasten (in Russisch). - Dok. Akad. Nauk. SSSR 177, 464 - 467

LOENING, U.E., 1967: The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide gel electrophoresis. - Biochem. J. 102, 251 - 257

LORENZEN, H. und RUPPEL, H.G., 1960: Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der Chlorella-Zelle. - Planta (Berl.) 54, 394 -403

MANDELL, J.D. und HERSHEY, A.D., 1960: A fractionating column for analysis of nucleic acids. - Analyt. Biochem. 1, 66 - 77

MAURER, H.R., 1968: Diskelektrophorese. - Berlin: Walter de Gruyter & Co.

NUDEL, U. und BAMBERGER, E.S., 1971: Kinetin inhibition of ^{3}H-uracil and ^{14}C-leucin incorporation by tobacco cells in suspension culture. - Plant Physiol. 43, 400 - 403

PARISH, J.H. und KIRBY, K.S., 1966: Reagents which reduce interactions between ribosomal RNA and rapidly labelled RNA from rat liver. - Biochim. Biophys. Acta 129, 554 - 562

PÄTAU, K., 1943: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel). - Biologisches Zentralblatt 63

PAUL, D., 1970: Über Regulationserscheinungen im Enzymsystem der Primärblätter von Phaseolus vulgaris L. - Diplomarbeit Göttingen

RAUEN, H.M. (Hrsg.), 1964: Biochemisches Taschenbuch. - Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer-Verlag

REISNER, A.H., ROWE, J. und MACINDOE, H.M., 1968: Structural studies on the ribosomes of Paramecium: Evidence for a "primitive" animal ribosome. - J. mol. Biol. 32, 587 - 610

RICHMOND, A.E., SACHS, B. und OSBORNE, D.J., 1971: Chloroplast, kinetin, and protein synthesis. - Physiol. Plant.24, 176 - 180

ROYCHOUDHURY, R., DATTA, A. und SEN, S.P., 1965: The mechanism of action of plant growth substances: The role of nuclear RNA in growth substances action. - Biochim. Biophys. Acta 107, 346 - 351

RUPPEL, H.G. und van WYK, D., 1965: Über die Desoxyribonucleinsäure in Chloroplasten von Antirrhinum majus. - Z. Pflanzenphysiol. 53, 32 - 38

SCOTT, N.S., NAIR, H. und SMILLIE, R.M., 1971: The effect of red irradiation on plastid ribosomal RNA synthesis in dark-grown pea seedlings. - Plant Physiol. 47, 385 - 388

SEESCHAAF, K.W., 1967: Über die Bildung von Enzymen in den Cotyledonen der Lupine und ihre Regulation durch den übrigen Keimling. - Dissertation Göttingen

SIMARD, A., 1971: Initiation of DNA-synthesis by kinetin (FAP) and experimental factors in tobacco pith tissues in vitro. - Can. J. Bot. 49, 1541 ff.

SKOOG, F., 1954; zit. bei KEY, J., 1969: Hormon and nucleic acid metabolism. (sh. o.)

SKOOG, F. und ARMSTRONG, D.J., 1970: Cytokinins. - Ann. Rev. Plant Physiol. 21

SMILLIE, R.M. und SCOTT, N.S., 1969: Organelle biogenesis: The chloroplast, in: F.E. HAHN (ed.): Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. I, 136 - 202. - Berlin: Springer-Verlag

SMITH, H., 1970: Changes in plastid ribosomal RNA and enzymes during the growth of barley leaves in darkness. - Phytochemistry 9, 965 - 975

SPREY, B. und GIETZ, N., 1973: Isolation of etioplasts and electron micrographs of membrane associated etioplast-DNA. - Z. Pflanzenphysiol. 68, 397 - 414

SRIVASTAVA, B.J.S. und ARGLEBE, C., 1968: Effect of kinetin on ribosomes of excised barley leaves. - Physiol. Plant. 21, 851 - 857

STETLER, D.A. und LAETSCH, W.M., 1965: Kinetin-inducet chloroplast maturation in cultures of tobacco tissue. - Science 149, 1387 - 1388

SUGIURA, M., 1963; zit. bei KIRK, I.T.O., 1970: Biochemical aspects of chloroplast development. (sh. o.)

TREHARNE, K.J., STODDART, J.L., PUGHE, J., PARANJOTHY, K. und WAREING, P.F., 1970: Effects of gibberellin and cytokinins on the activity of photosynthetic enzymes and plastid ribosomal RNA synthesis in Phaseolus vulgaris L. - Nature 228, 129 - 131

TREWAVAS, A., 1970: The turnover of nucleic acids in Lemna minor. - Plant Physiol. 45, 742 ff.

WAREING, P.F., KHALIFA, M.M. und TREHARNE, K.J., 1968: Rate-limiting processes in photosynthesis at saturating light intensities. - Nature 220, 453 - 457

WEINBERG, R., 1973: Nuclear RNA metabolism. - Ann. Rev. Biochem. 42, 329 ff.

WOLLGIEHN, R. und MUNSCHE, D., 1972: RNA-Synthese in isolierten Chloroplasten von Nicotiana rustica. - Biochem. Physiol. Pflanze 163, 137 - 155

ZEIDLER, H., 1973: Über den lichtabhängigen Stoffwechsel von Chlorogonium elongatum Dangeard bei autotropher Anzucht. - Dissertation Göttingen

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. J. Feierabend, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der endgültigen Abfassung dieser Arbeit.

Von März 1972 an wurde diese Arbeit durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz unterstüzt.

Lebenslauf

Dierk Paul, geboren am 6. September 1941 in Uslar als Sohn des kaufm. Angestellten Rudolf Paul (gefallen 1945) und seiner Ehefrau Selma, geb. Meyer; Stiefvater Günther Hübsch, Realschulrektor.

1948 - 1951	: Grundschule in Uslar
1951 - 1952	: Grundschule in Hoykenkamp
1952 - 1962	: Gymnasium an der Willmsstraße in Delmenhorst
21. Februar 1962	: Reifeprüfung
April 1962 - März 1964	: Wehrdienst bei der Bundeswehr
April - Oktober 1964	: Pädagogische Hochschule in Oldenburg
November 1964 - März 1965	: Sprachenstudium, Universität Göttingen
ab April 1965	: Studium Biologie und Chemie, Universität Göttingen
Oktober 1970	: Diplom (Biologie)
März 1971	: Beginn mit der vorliegenden Dissertation am Pflanzenphysiologischen Institut der Georg-August-Universität in Göttingen.

Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren die Herren Professoren:
Amelunxen, Ax, Birukow, Bergmann, Brockmann, Bünsow, Ellenberg, Feierabend, Glemser, Graebe, Heberer, Hilsch, Jacobi, Jost, Lorenzen, Piepho, Pirson, Röbbelen, Schlegel, Schlote, Spiteller, Trebst, Ziegler.